

Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus
der Phenylalanin-4-Monooxygenase
(EC.1.14.16.1)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
Maria-Jolanta Zagalak-Hofman
aus Poznan u. Radom (Polen)

Begutachtet von den Herren
Prof. Dr. Max Viscontini
Prof. Dr. Manfred Hesse und
Prof. Dr. Hans-Christoph Curtius

Zürich 1986

ADAG Administration & Druck AG

Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus
der Phenylalanin-4-Monooxygenase
(EC.1.14.16.1)

INAUGURAL-DISSERTATION

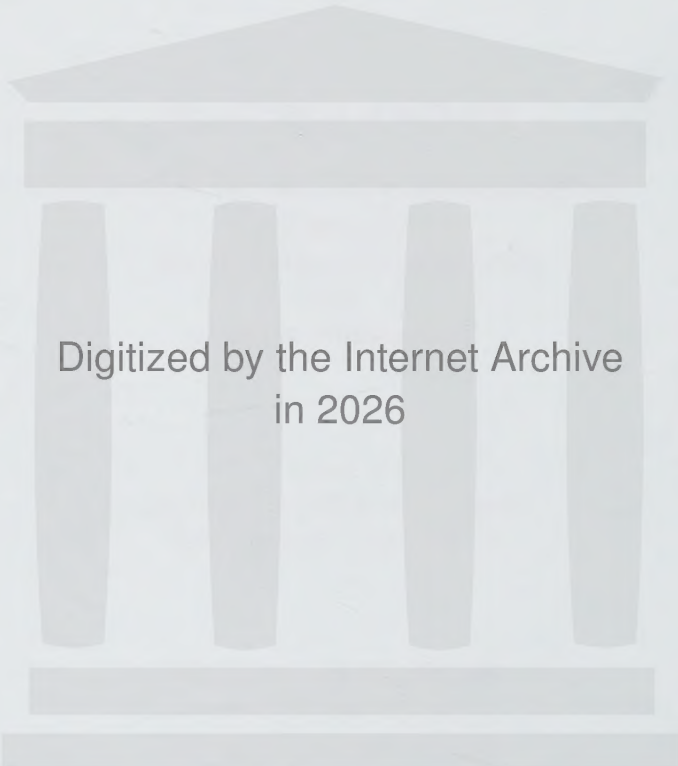
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
Maria-Jolanta Zagalak-Hofman
aus Poznan u. Radom (Polen)

Begutachtet von den Herren
Prof. Dr. Max Viscontini
Prof. Dr. Manfred Hesse und
Prof. Dr. Hans-Christoph Curtius

Zürich 1986

ADAG Administration & Druck AG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Pamięci Mojej Babuni Ireny B.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof.Dr. Max Viscontini

möchte ich für seine wertvolle Ratschläge, seine umsichtige Führung und das mir stets entgegengebrachte Vertrauen und Wohlwollen meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Besonderen Dank schulde ich auch

Herrn Prof.Dr. Hans-Christoph Curtius

in dessen Laboratorium diese Arbeit realisiert wurde, für die stetige Förderung und das Interesse an diesem Thema, sowie für seine wertvolle Unterstützung.

Herrn Prof.Dr. Manfred Hesse

möchte ich für seine mannigfaltige Anteilnahme und grosses Verständnis herzlich danken.

Herrn Udo Redweik, Herrn Frank Neuheiser und meinem Mann gebührt mein Dank für ihre grosse Hilfe bei der Gestaltung dieses Manuskripts.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung	9
1.1. Geschichtlicher Ueberblick	9
1.2. Heutiges Wissen über die Phenylalanin-4-Monooxygenase	11
1.2.1. Wirkungsmechanismus der Hydroxylierung	11
1.2.2. Eigenschaften des Enzyms	22
1.3. Zielsetzung dieser Arbeit	29
2. Analytische Methoden	31
2.1. Theoretischer Teil	31
2.2. Experimenteller Teil	37
2.2.1. Optimale Zusammensetzung des "Enzym-Assays"	37
2.2.2. Proteinbestimmung	44
2.2.3. Nachweismethoden für das entstehende L-Tyrosin	46
2.2.3.1. Bestimmung mit der 1-Nitroso-2-naphthol-	
methode	47
2.2.3.2. Direkte UV-Messung	47
2.2.3.3. "Indirekte" UV-Messung	49
2.2.3.4. Quantitative Bestimmung mit Hilfe der Gas-	
chromatographie	49
2.2.3.4.1. Synthese der GC-Derivate	50
2.2.3.4.2. Gaschromatographisches Ver-	
fahren	56
2.2.3.5. Quantitative Bestimmung mittels der	
GC-MS/SIM - Technik	62
2.2.3.5.1. Synthese von deuteriertem	
Phenylalanin und Tyrosin	62
2.2.3.5.2. Durchführung der Methode	67
2.2.4. Vergleich der ausgearbeiteten Nachweismethoden	69
2.3. Diskussion und Zusammenfassung	69
3. Isolierung und Reinigung des Enzyms	71
3.1. Theoretischer Teil	71
3.2. Experimenteller Teil	74
3.2.1. Klassisches Verfahren	74

	Seite
3.2.2. Affinitätschromatographie	77
3.2.3. Hydrophobe Chromatographie	80
3.3. Diskussion und Zusammenfassung	84
4. Cofaktorstudien	86
4.1. Theoretischer Teil	86
4.2. Experimenteller Teil	91
4.2.1. Herstellung und Kontrolle der Lösungen	93
4.2.2. Bestimmung der Cofaktor-Aktivität	94
4.2.3. Resultate	96
4.3. Diskussion und Zusammenfassung	98
5. Klinisch diagnostische Anwendung der analytischen Methoden	99
5.1. Theoretischer Teil	99
5.2. Experimenteller Teil	102
5.2.1. Indirekte " <u>in vivo</u> " Enzymaktivitätsbestimmung ...	102
5.2.1.1. Belastung mit L-Phenylalanin " <u>per os</u> "...	102
5.2.1.2. Proben-Vorbereitung	102
5.2.1.3. Derivatisierung der Proben	103
5.2.1.4. GC-MS Analyse mit SIM-Methode	103
5.2.1.5. Genauigkeit, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit	105
5.2.1.6. Resultate	106
5.2.2. Direkte " <u>in vitro</u> " Enzymaktivitätsbestimmung	109
5.3. Diskussion und Zusammenfassung	113
6. Literaturverzeichnis	115
7. Zusammenfassung	123
8. Addendum	124
9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	127

1. EINLEITUNG

Die Phenylalanin-4-Monooxygenase (EC 1.14.16.1), das Enzym, das die Reaktion $\text{L-Phenylalanin} + \text{Tetrahydropteridin} + \text{O}_2 = \text{L-Tyrosin} + \text{Dihydropteridin} + \text{H}_2\text{O}$ katalysiert, stellt das Hauptthema dieser Arbeit dar. Nach den Bestimmungen von IUPAC/IUB wird der vollständige, systematische Name dieses Enzyms mit "L-Phenylalanin, Tetrahydropteridin : Sauerstoff Oxidoreduktase (4-hydroxylierend)" angegeben, was sich auch im Enzymcode widerspiegelt. Als zulässig wird noch die triviale Benennung "Phenylalanin-4-Hydroxylase" oder auch "Phenylalaninase" betrachtet, da die Mehrheit der bisherigen Veröffentlichungen diesen Namen verwendet [1]. Die Rolle, die dieses Enzym im Stoffwechsel spielt, kann wie folgt kurz beschrieben werden: die Konversion des L-Phenylalanins ins L-Tyrosin dient im Metabolismus der höheren Organismen einem doppelten Zweck. Erstens ist sie eine Stufe im Abbau des L-Phenylalanins und zweitens ist sie die endogene Quelle für L-Tyrosin und seine Metaboliten, wie die Katecholamine und den Neurotransmitter Serotonin. Solange die 4-Hydroxylierung des L-Phenylalanins funktioniert, ist L-Tyrosin keine essentielle Aminosäure. Dieses Enzymsystem ist jedoch ziemlich kompliziert, und es gibt mehrere Faktoren, die über seine Funktionsfähigkeit entscheiden. Im Gegensatz zu den Säugetieren wird in bakteriellen Systemen die Hydroxylierung der aromatischen Substrate durch eine Gruppe von Monooxygenasen, die z.T. Dihydroflavin als Cofaktor brauchen, katalysiert.

1.1 Geschichtlicher Ueberblick

Die Phenylalanin-4-Monooxygenase gehört zu den Enzymen, deren Vorhandensein und Wichtigkeit für den Organismus des Menschen ziemlich früh, wenn auch noch nicht direkt festgestellt und beschrieben worden sind. Schon 1934 hat der norwegische Biochemiker Følling [2] eine besondere mentale Retardierung, auch Phenylketonurie (PKU) oder Føllingsche Krankheit genannt, anhand der Ausscheidung von Phenylpyruvat im Urin, sowie eines erhöhten

Phenylalanin-Blutspiegels, einem Defekt im Stoffwechsel des L-Phenylalanins zugeschrieben. Die entscheidende Stufe dieses Metabolismus haben 1940 Moss et al. [3] identifizieren können, indem sie nach Gabe des markierten 3- ^{14}C -DL-Phenylalanins bei Ratten die Anwesenheit sowohl des markierten Phenylalanins, wie auch des markierten Tyrosins in den Körperproteinen nachgewiesen hatten. 1947 konnte Jervis [4] eine Serie von Belastungen mit L-Phenylalanin bei Tieren und bei Menschen durchführen und dabei feststellen, dass dies in normalen Fällen eine Zunahme des Tyrosins im Blut bewirkt. Bei den Phenylketonurikern vermisste man diese Auswirkungen vollkommen. Somit konnte die Festlegung des enzymatischen Defekts für die Phenylketonurie auf den Uebergang Phenylalanin zu Tyrosin erfolgen. Diese "in vivo" Beobachtungen hat Jervis später [5] auch im Reagenzglas mit einer Portion der von Phenylketonurikern stammenden Leber bestätigen können.

Die ersten Versuche im Bezug auf die Isolierung des Enzyms, das für die Umwandlung des L-Phenylalanins in L-Tyrosin verantwortlich ist, wurden im Jahre 1952 von S. Udenfriend et al. [6] durchgeführt. Sie zeigten, dass in Rattenleberhomogenat die Hydroxylierung von Phenylalanin nur aerob abläuft. In reinem Sauerstoff verlief diese Hydroxylierung weniger gut. Experimente mit $^{18}\text{O}_2$ und H_2^{18}O zeigten, dass der phenolische Sauerstoff im L-Tyrosin nur aus dem molekularen Sauerstoff stammt [7].

Das Enzymvorkommen, die Bedingungen und Resultate verschiedener Versuche von Udenfriend et al. und anderen Autoren sind in den Tabellen I und II dargestellt.

Bemerkenswerterweise fiel der Nachweis der Enzymaktivität in der Leber bei allen untersuchten Species positiv aus. Die Angaben der beiden Tabellen sind untereinander nicht unbedingt vergleichbar, da sich sowohl die Bedingungen, wie auch der Reinheitsgrad des angewendeten Enzympräparates bei den verschiedenen Autoren stark voneinander unterscheiden.

Der Beitrag von Mitoma [17], der eine weitergehende Reinigung der Phenylalanin-4-Monooxygenase brachte, leitete eine neue Phase in der Geschichte der Forschung über dieses Enzym ein.

Die Komplexität des Phenylalanin-4-Monooxygenase Systems wurde schon damals insofern erkannt, als sowohl Mitoma [17], wie auch später Kaufman [38] gewusst haben, dass in dem von ihnen untersuchten System mindestens zwei Enzyme beteiligt sind.

Im Jahre 1958 wurde aus Rattenleber ein nicht proteinartiger Cofaktor der Hydroxylierung isoliert [39] und später als 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin identifiziert [40]. Dieser Cofaktor wird in der erwähnten Reaktion ohne Regenerierungssystem stöchiometrisch (1:1) verbraucht.

1.2 Heutiges Wissen über die Phenylalanin-4-Monooxygenase

1.2.1 Wirkungsmechanismus der Hydroxylierung

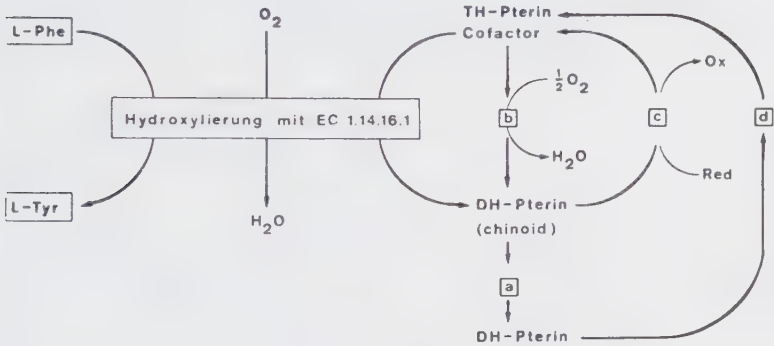


Abb.1 Schema des Wirkungsmechanismus der Phenylalanin-4-Monooxygenase nach Nielsen [18]

- Spontane Bildung des stabileren, inaktiven Dihydropterin-Tautomeren (Kinetik I-er Ordnung).
- Aerobe Oxidation des Tetrahydropterin-Cofaktors zum aktiven, aber instabilen chinoiden Dihydropterin (Kinetik I-er Ordnung).
- Reduktion des aktiven, chinoiden Dihydropterins zum Tetrahydropterin-Cofaktor (Kinetik II-er Ordnung). Diese Reduktion kann mit bekannten Reduktionsmitteln wie zum Beispiel 2-Mercaptoethanol, Ascorbinsäure, Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE) etc., oder auch enzymatisch mit Dihydropteridin-Reduktase (EC 1.6.99.7) und NADH (o. NADPH) als Cofaktor stattfinden.
- Diese Reduktion wird nur durch die Dihydrofolat-Reduktase (EC 1.5.1.3) katalysiert.

Natürlich gibt dieses Schema nur einen Einblick in die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Substraten dieser Stoffwechselstufe. Es zeigt nur insofern klar, dass die Hydroxylierung des L-Phenylalanins, die durch die Phenylalanin-4-Monooxygenase katalysiert wird, über einen quaternären Komplex, der aus dem Enzym selbst, aus L-Phenylalanin, molekularem Sauerstoff und dem Tetrahydropterin-Derivat besteht, erfolgt. Dieser Mechanismus stellt einen sogenannten "rapid equilibrium random" Typus dar [41], im

Tabelle I : Vergleich der "enzyme assays" für Phenylalanin-

Autoren	Assay - Komponenten						
	Puffer [M]	pH	L-Phe [mM]	Cofaktor [mM]	Enzym	Katalase [per ml]	Antioxidans [mM]
Rattenleber							
Al-Janabi [8]	0,1 Tris	7,5	1,0	6,7-Me ₂ THPt 0,2	gereinigt	0,25 mg	DTT 5,0
Ayling [9]	0,1 Tris	7,5	1,0	6,7-Me ₂ THPt 0,2	gereinigt lyophilisiert	0,50 mg	DTT 10,0
Bublitz [10]	0,1 Tris	7,2	2,0	6,7-Me ₂ THPt 0,4	gereinigt	-	DTT 10,0
Namoodiri [11]	0,1 Tris	7,2	2,0	6,7-Me ₂ THPt 0,45	"	-	DTT 10,0
Weber [12]	0,1 Tris	7,4	2,0	THBPT 0,4	"	0,80 mg	DTE 2,0
	0,1 Tris	7,4	1,5	6,7-Me ₂ THPt 0,15	"	0,40 mg	-
Zannoni [13]	0,05 Na ₂ PO ₄	7,0	2,0	6,7-Me ₂ THPt 0,7	crude extract	-	MER 0,005
Udenfriend [6]	0,12 K ₂ PO ₄	6,7	1,6	-	Homogenat dial.	-	-
Christensen [14]	0,1 K ₂ PO ₄	6,8	2,0	6,7-Me ₂ THPt 1,0	crude extract	-	-
Nakata [15]	0,1 K ₂ PO ₄	6,8	2,0	6,7-Me ₂ THPt 0,4	gereinigt	0,40 mg	DTT 4,0
La Du [16]	0,2 K ₂ PO ₄	7,0	1,33	" 0,05-1,55	crude extract	-	-
Mitoma [17]	0,1 K ₂ PO ₄	7,0	1,33	-	gereinigt	-	-
Nielsen [18]	0,1 K ₂ PO ₄	6,8	2,0	6,7-Me ₂ THPt 0,2	"	600 E.	ASC 10,0
Brase [19]	0,04 K ₂ PO ₄	7,4	1,0	6,7-Me ₂ THPt 0,45	"	-	DTT 10,0
Tourian [20]	0,1 K ₂ PO ₄	7,0	2,0	THPt-Derivat 1,0	"	-	DTT 10,0
Shiman [21,22]	0,1 K ₂ PO ₄	6,8	1,0	6-MeTHPt 0,06	"	65 µg kr.	DTT 6,0
Kaufman [23]	0,1 K ₂ PO ₄	6,8	2,0	6,7-Me ₂ THPt 0,12	"	-	-
				6,7-Me ₂ THPt 14,0	"	-	-
Kaufman [24]	0,1 K ₂ PO ₄	6,8	2,0	6,7-Me ₂ THPt 0,1	gereinigt	7800 E.	-
andere Enzymquellen							
Kaufman [33]	0,1 K ₂ PO ₄	6,8	2,0	6,7-Me ₂ THPt 0,1	menschl. Leber gereinigt	7800 E.	-
Woolf [25a]	0,2 Na ₂ PO ₄	6,8	10,0	6,7-Me ₂ THPt 0,5	---kein----	-	DTT 5,0
Guroff [26]	1,0 Tris	7,3	4,0	6,7-Me ₂ THPt 0,6	<i>Pseudomonas</i> sp gereinigt	-	MER 0,1
Miller [25]	0,082 K ₂ PO ₄	6,8	0,2	6-MeTHPt 0,09	<i>Hepatomazellen</i> gereinigt	16 µg kr.	DTT 2,1
Ishimitsu [27]	0,05 Citrat	6,0	4,0	6,7-Me ₂ THPt 0,3	Rattenhirn Homogenat	-	MER 10,0
Cotton [28]	0,02 Tris	8,7	4,0	6,7-Me ₂ THPt 0,5	Affenleber gereinigt	-	DTT 2,0

A - 1-Nitroso-2-naphthol spektrofot. $\lambda = 450$ nm

B - " Fluorimetr. Anregung $\lambda = 470$ nm, Fluoreszenz $\lambda = 555$ nm

C - Spektrofotometrisch bei $\lambda = 330 - 340$ nm

D - Papierchromatographie

E - direkt in Küvette, spektrofot. $\lambda = 275$ nm

F - isotope dilution technique mit [¹⁴C]-L-Phenylalanin

G - HPLC (high pressure liquid chromatography) mit Fluorimetrie

-4-Monooxygenase (EC 1.14.16.1)

A n d e r e :	A s s a y - B e d i n g u n g e n						Nachweismethode
	pH	Vorinkubation ohne Zeit [Min]	Temp. [°C]	Inkubation Zeit [Min]	Temp. [°C]		
-	-	Cof.	5	25	10 - 30	25	A , C
-	7,5	Cof.	5	27	10	27	A , B , C
-	7,2	-	5	25	10	25	A , B
-	-	L-Phe	5	30	20	30	
-	6,5	-	-	-	-	27	C
-	6,5	Cof.	3	21	kontin.	25	C
1,4 mM NADH	-	-	-	-	8	37	A
4 mM Nicotinamid, 0,44mM NADH	7,0	-	-	-	120 0,30	25	A , D
-	-	-	-	-	16	25	A
-	5,6	-	-	-	5	24	B
3,33mM Nicotinamid, 0,53mM NADPH	-	-	-	-	45	25	A , B
3,33mM Nicotinamid, 0,33mM NADH	7,0	-	-	-	15	37	A
-	-	L-Phe Enzym	4-5	30	4 - 5	30	A
-	-	L-Phe	5	30	20	30	
-	7,2	-	10	25	1	25	
-	6,8	Cof., DTT	3	25	kontin.	25	E
0,5mM NADPH, 0,125M Glucose, 80E./ml Gluc.Dehydrogenase	-	-	-	-	30	25	A
0,125 M Glucose, 80E./ml Gluc.Deh.	-	-	-	-	30	25	A , B
0,25mM NADP, 0,25mM Glucose, Gluc.Dehydr.u.DHPT-Redukt.	-	-	-	-	30	25	A , B
0,25mM NADP, 0,25mM Glucose, Gluc.Dehydr.u.DHPT-Redukt.	6,8	-	-	-	30	25	A , B
5mM Nicotinamid, 0,8mM NADH	-	-	-	-	-	25	
4mM NADH 1 mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	7,0	Enzym, Fe-Salz	10	30	10	30	A , B u. mit 4-[3H]-L-Phe
-	-	-	-	-	20	25	F
0,2mM Lysolecithin	-	-	-	-	30	37	G
-	-	-	-	-	30	37	B
-	7,5	Enzym	1	37	30	37	

Tabelle II Vorkommen der Phenylalanin-4-Monooxygenase (EC 1.14.16.1)

Organismus	Gewebe	A k t i v i t ä t	
		qualitativ	quantitativ*
R a t t e	Leber Lunge Nieren Gehirn Muskeln	+ [6,14,16,29] - [6] - [6,16] + [30] - [6,16] + [27] - [6]	100% [14,16,29]
G u i n e a p i g	Leber	+ [6,16,29]	54%[16], 72%[29]
K a n i n c h e n	Leber	+ [6,16,29]	36%[16], 51%[29]
H u n d	Leber	+ [6,14,16]	5%[14], 51%[16]
H u h n	Leber	+ [6,29]	28%[29]
A f f e (<i>Macaca irus</i>)	Leber Nieren	+ [28] - [31]	
S c h a f f	Leber	+ [14]	3%[14]
S c h w e i n	Leber	+ [14]	8%[14]
R i n d	Leber	+ [14]	13%[14]
P f e r d	Leber	+ [14]	4%[14]
M a u s	Leber Nieren Pancreas Herz,Lunge,Haut Muskeln,Darm,Thy- mus	+ [32] + [32] + [32] - [32]	
M e n s c h	Leber Nieren	+ [6,14,16,33] - [31] + [34]	46%[14],30%[16],82%[33]
<i>S. faecalis</i>	Zellsuspension	- [6]	
<i>E. coli</i>	Zellsuspension	- [6]	
H e f e	Zellsuspension	- [6]	
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Zellsuspension	+ [35]	
<i>Pseudomonas</i> sp (ATCC 11299a)	Zellsuspension	+ [26,36]	
<i>Hepatoma</i> (H-4-II-E-C3)	Zellkultur	+ [25,37]	

* relativ zu Rattenleber (100%)

Unterschied zum für die Dopamin- β -Monooxygenase (EC 1.14.17.1) festgestellten "ping-pong" Typus [42]. Wie bereits erwähnt, wurde der Cofaktor und seine Wichtigkeit im Enzymsystem der Phenylalanin-4-Monooxygenase von Kaufman et al. [39] entdeckt. Der zur Tetrahydrostufe reduzierte und unkonjugierte Cofaktor wird als Elektronendonator in der Hydroxylierung des aromatischen Rings benötigt [43]. Pterin wird nur schwach an das Protein gebunden und ist deswegen als Coenzym zu betrachten. Die relative Reaktivität mit molekularem Sauerstoff ist eher niedrig ($t_{1/2} \approx$ Minutengrösse). Die tetrahydropterin-abhängige Monooxygenase spaltet ein Sauerstoffmolekül, um ihr Aminosäure-Substrat zu hydroxylieren (wahrscheinlich über ein Arenoxid als Zwischenprodukt). Dabei wird das übriggebliebene Sauerstoffatom auf Kosten des Cofaktors, d.h. des Tetrahydropterins, das selbst zum chinoiden Dihydropterin umgewandelt wird, zu Wasser reduziert. Das Entstehen des chinoiden Tautomerer des Dihydropterins, und zwar des p-chinoid-Dihydropterins, wurde durch mehrere Forscher untersucht [44] und unter anderem mit 8- $[^3\text{H}]$ -markiertem Cofaktor bewiesen [40,45-51]. Es scheint, dass diese p-chinoide Species ein gemeinsames Produkt sowohl für die enzymatische wie auch für die chemische Oxidation des Tetrahydropterins darstellt [46]. Es ist jedoch beobachtet worden, dass infolge der Oxidation zuerst ein labiles Zwischenprodukt entsteht, das sich zunächst zur p-chinoiden Form des Dihydropterins umlagert [52]. Gleichzeitig tauchten noch zusätzliche Fragen auf, nämlich auf welche Art der sonst so unreaktive molekulare Sauerstoff aktiviert wird, an welcher Stelle des Enzymsystems sich diese Aktivierung vollzieht und letztlich, welche chemische Struktur das Zwischenprodukt oder die hydroxylierende Species besitzt.

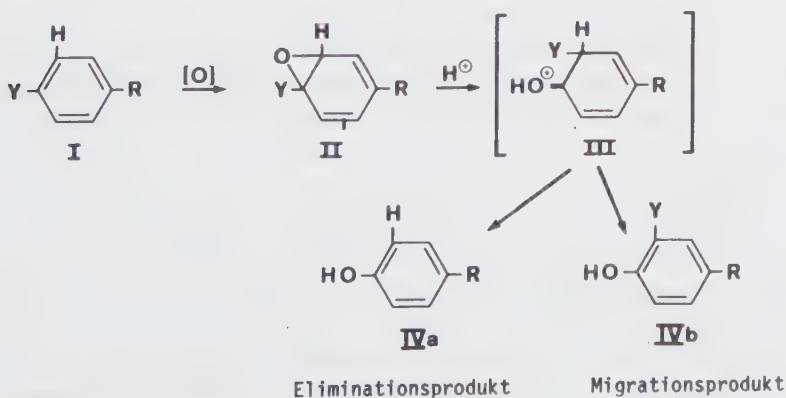


Abb.2 Allgemeines Schema des "NIH-Shifts"

Die enzymatische Hydroxylierung der aromatischen Aminosäuren wird nach Guroff [53] durch den sogenannten "NIH-Shift" begleitet, siehe Abb.2 [54]. Das Entstehen der Produkte aus dem Zwischenprodukt (III) wird durch den Bindungsenergieunterschied zwischen C-H und C-Y bestimmt [55]. Das ausschliessliche Eliminationsprodukt (IVa) konnte für Y=F isoliert werden [56], dagegen findet der Shift (Migration) zum Produkt (IVb) anscheinend zu 100% statt, wenn Y=Cl, Br, [³H] oder [²H] ist [53,56]. Als typisches Beispiel für eine Verbindung, für die beide Prozesse anscheinend gleich gut verlaufen, kann das 4-Methyl-L-phenylalanin dienen [57]. Bei der Mitwirkung des Dihydroflavins als Cofaktor, also für die Flavin-abhängigen Monooxygenasen, wird der "NIH-Shift" nicht beobachtet [58]. Die Existenz des Arenoxids (II) spricht für die Wirkung eines oxenoiden Reagenzes als wirksamer Sauerstoffform, was dann den folgenden Reaktionsablauf ergäbe (Abb.3):



Abb.3 Aktivierung des molekularen Sauerstoffs (wobei Y=O)

Als effektives Oxidationsmittel tritt hier ein oxenoides Reagens auf, das nur ein einzelnes Sauerstoffatom in einem Schritt überträgt [59]. Es wurde angenommen, dass es sich dabei um eine Form des Sauerstoff-Tetrahydropterin-Adduktes handelt. Mögliche hypothetische Strukturen für ein solches Addukt könnten wie folgt aussehen (Abb.4).

Berends und Mitarbeiter [60] haben das 4a-Hydroperoxid (VI) oder 8a-Hydroperoxid (VII) als hydroxylierende Species postuliert. Dies wurde jedoch von anderen Forschern [61,62] in Zweifel gezogen, weil es keine chemische Analogie gibt, wobei die Hydroxylierung der Aromaten durch Alkylhydroperoxide ohne Mitwirkung von Metallionen stattfinden kann. Als Alternative wurde dann das Oxaziridin-Derivat (VIII) vorgeschlagen [61]. Keines der Oxaziridine zeigte jedoch bis jetzt oxenoide Eigenschaften [63]. Daher wäre auch das Carbonyloxid (IX) oder sein Tautomer (ringförmiges Ozonid) (X) als wahrscheinlicher zu betrachten, umso mehr, als die oxenoide Wirkung solcher Strukturen schon nachgewiesen worden ist [63,64]. Nach der Uebertragung von Sauerstoff an das aromatische Substrat könnte das freigewordene N-(5)-Amin und das Carbonyl am C(4a) als Schiff'sche Base kondensieren und zu einem intermediären 4a-Hydroxid recyclieren. Dieses auch für andere postulierte Mechanismen [59,60] angenommene Zwischenprodukt bildet durch Elimination

von Wasser ein para-chinoides Dihydropterin-Derivat.

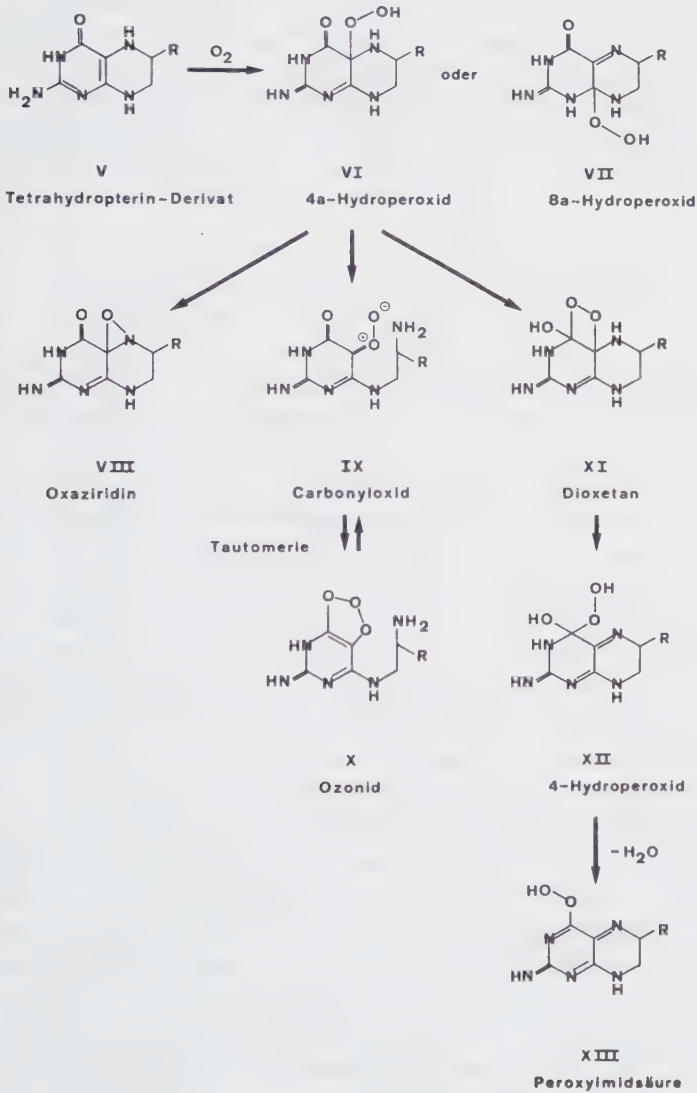


Abb.4 Sauerstoff-Tetrahydropterin-Addukte

Eine weitere sich anbietende Möglichkeit wäre die Umwandlung des 4a-Hydroperoxids (VI) [59] (wie das für andere α -Hydroperoxyamide bekannt ist [65]) zum Dioxetan-Zwischenprodukt (XI). Dieses könnte unter Beteiligung des freien Elektronenpaares am benachbarten N-(5)-Atom einer Ringöffnung unterliegen, womit ein 4-Hydroperoxid (XII) entstünde, welches nach Wassereliminierung eine Peroxyimidsäure (XIII) ergäbe. Die Peroxyimidsäuren sind stärkere Oxenoidreagenzien als die Peroxysäuren [66]. Die Peroxysäuren können als einzige organische Verbindungen die Aromaten nach folgendem Reaktionsschema unter Ausführung eines "NIH-Shifts" hydroxylieren [67]:

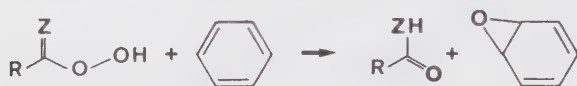


Abb.5 Hydroxylierung der Aromaten - NIH-Shift

wenn $\text{Z}=\text{O}$ Peroxysäure ; wenn $\text{Z}=\text{N}-\text{R}'$ ($\text{R}'=\text{Alkyl}, \text{Aryl}$) Peroxyamid

Verhältnismässig wenige Hypothesen wurden bisher für den ersten Schritt der Sauerstoffaktivierung, d.h. für die direkte Reaktion des molekularen Sauerstoffs mit dem reduzierten Cofaktor, formuliert. Hamilton [68] hat sehr deutlich eine Einschränkung der mechanistischen Möglichkeiten für die Interaktion von Sauerstoff im Triplett-Grundzustand mit organischen Substraten gezeigt. Da die Reaktion einer solchen Form des Sauerstoffs mit einer Singulett-Species (wie es die Aromaten im Grundzustand sind) eine Spin-Inversion verlangt und somit kinetisch sehr ungünstig liegt ($1\text{-}10^{-9}$ sec), nimmt man im allgemeinen an, dass zuerst das Molekül des Sauerstoffs zwei Radikale oder eine Dublett-Species bildet [69].

Der von Viscontini [69] postulierte, durch ein Sauerstoff-Biradikal gestartete Mechanismus (Abb.6) konnte auch anhand der besonders für diese Zwecke synthetisierten Verbindungen experimentell zum Teil bewiesen werden. Nach Überprüfung eines chemischen Modells für die Hydroxylierung des Phenylalanins hat man das 6,7-Diphenyl-N(5)-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin hergestellt. In dieser Verbindung ist durch die Substituierung des H-Atoms am N(5) durch eine Methylgruppe die Bildung des p-quinoiden Dihydropterins verhindert. Als stabiles Zwischenprodukt konnte man das 4a-Hydroxid-Derivat isolieren, da es nicht imstande war, die Elimination von Wasser durchzuführen. Man konnte auch das Vorkommen des Radikalkation-Komplexes zwischen einem Mol Fe^{III} und zwei Molen Tetrahydropterin nachweisen [70,71]. Die Rolle des Eisenatoms im Mechanismus wurde somit deutlich hervorgehoben. Die biochemischen Experimente erbringen dafür einen bestätigenden Beweis.

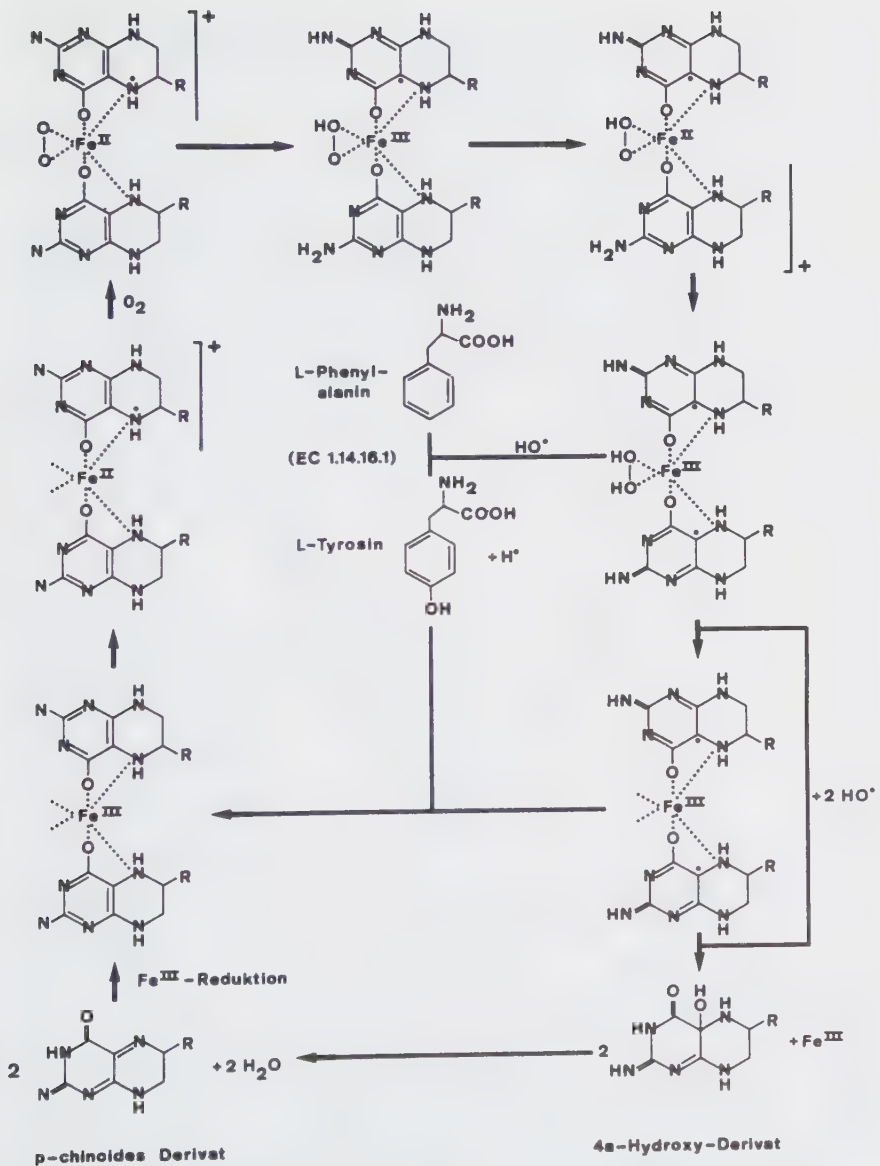


Abb.6 Mechanismus der Sauerstoffaktivierung und die Rolle des Cofaktors nach Viscontini [69].

Mittels EPR hat man feststellen können, dass das Enzym Phenylalanin-4-Mono-oxygenase pro 50'000 Dalton-Subeinheit ein Atom proteingebundenes Fe^{III} besitzt, dessen Entfernung (auch nur zu 80%) einen totalen Verlust der Enzymaktivität verursacht [72].

Auf Grund der Arbeit von Turro et al. [73] weiss man, dass Sauerstoff im Triplett-Grundzustand mit organischen Molekülen, insbesondere mit den gespannten zyklischen Alkinen, reagieren und einen Singulett-Sauerstoff bilden kann (Abb.7). Ein Paar der π -Elektronen des Acetylenmoleküls bildet mit dem Triplett-Sauerstoff einen Komplex, in welchem die beiden ungepaarten Elektronen des molekularen Sauerstoffs sich an einem Sauerstoffatom befinden. Theoretisch ist dies eine gute Voraussetzung für die Spin-Inversion, da in einem solchen Komplex sowohl die freie Aktivierungsenergie, als auch die benötigte Zeit herabgesetzt wird. Es entsteht ein Perepoxid als Singulett-Komplex, das über Dioxeten zum angeregten Zustand des 1,2-Dions reagiert, oder aber den Singulett-Sauerstoff verliert und somit das Ausgangsalkin regeneriert.

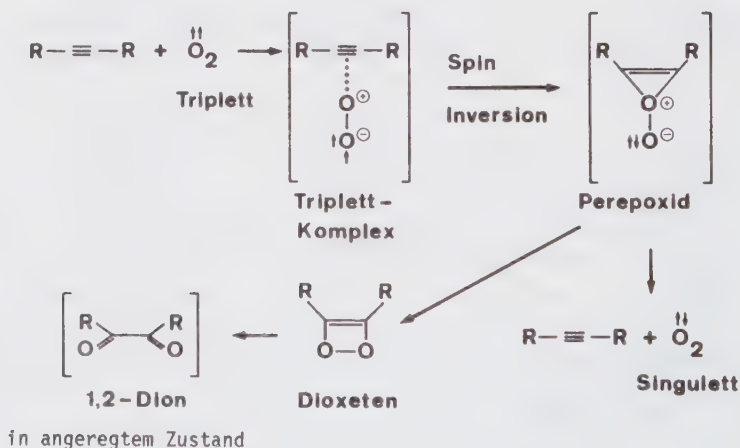


Abb.7 Reaktion des Triplett-Sauerstoffs mit Alkinen

Wenn man diese Beobachtungen zu mechanistischen Ueberlegungen für die enzymkatalysierte Hydroxylierung der aromatischen Aminosäuren in Gegenwart des Tetrahydropterin-Cofaktors anwendet, kommt man zu folgendem Reaktionsablauf:

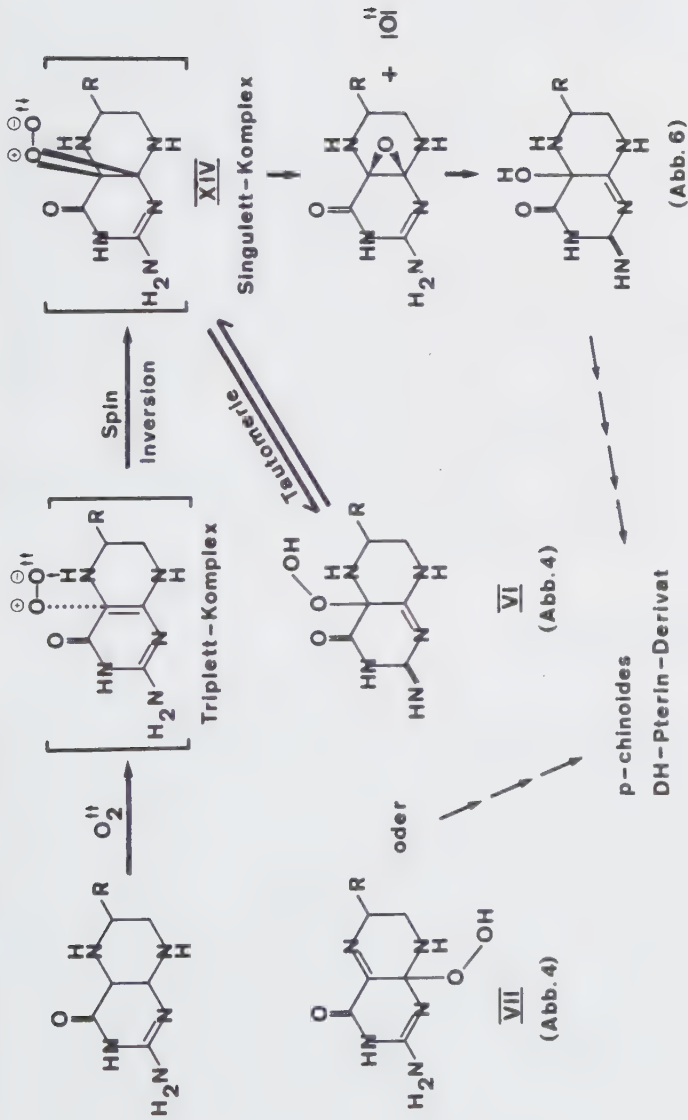


Abb. 8 Reaktion des Triplet-Sauerstoffs mit Tetrahydropteninen

Nach MINDO-3 Berechnungen haben Dewar et al. [74] vorausgesagt, dass die aus der Reaktion zwischen dem Singulett-Sauerstoff und Olefinen resultierenden Peroxide sehr starke oxenoiden Reagenzien darstellen.

Ein solcher Mechanismus wäre aus mehreren Gründen akzeptabel. Er würde mit folgenden Beobachtungen übereinstimmen: stöchiometrische Verhältnisse, "NIH-Shift", einfache Bildung der oxenoiden Species in einer Einschritt-Reaktion und Aktivierung des Sauerstoffs, die nur minimale strukturelle Veränderungen des Cofaktors verursacht. Ausserdem entsteht die oxidierte Form des Cofaktors direkt aus dem Epoxid, das seinerseits sofort nach dem Uebergang des Singulett-Sauerstoffatoms auf das Substrat gebildet wird. Das Vorkommen des Wasserstoffperoxids im System kann durch den Verlust von H_2O_2 aus dem Hydroperoxid (VI) oder (VII) in Abwesenheit des dafür geeigneten Substrats erklärt werden. Schlussendlich kann die fehlende Inhibition der Monooxygenasewirkung durch die Superoxid-Dismutasen mit der nichtvorkommenden Superoxid-Struktur des Uebergangszustands erklärt werden.

Es fehlen noch Experimente, die den Mechanismus der biologischen Hydroxylierung der aromatischen Substrate bestätigen können.

Mit dieser weitangelegten Diskussion der existierenden Hypothesen wurde versucht, zumindest viele theoretische Möglichkeiten zu berücksichtigen und sie nach ihrer Wahrscheinlichkeit zu beurteilen.

1.2.2. Eigenschaften des Enzyms

Das mammalian Enzym (die Phenylalanin-4-Monooxygenase) besteht aus zwei Isozymen mit verschiedener Ladung und identischem Molgewicht, die als Monomere (MG: 51'000 - 55'000), Dimere (MG: 110'000) oder Tetramere (MG: 210'000) vorkommen können [23]. Nach Cotton [75] kann die Phenylalanin-4-Monooxygenase unter speziellen Bedingungen auch als Species mit Molgewicht 250'000 vorkommen, was beim Affen, beim Menschen oder bei der Ratte "in vivo" festgestellt worden ist. Tourian et al. [30] behaupten, drei immunologisch unterscheidbare und non-cross-reagierende Isozyme in der Rattenleber gefunden zu haben, wovon eines mit demjenigen, das aus der Rattenleber isoliert wurde, identisch ist. Auch das Enzym, das aus der menschlichen Foetalleber isoliert wurde [76], zeigte das Molgewicht von 110'000. Die Reinigung und Isolierung erfolgte wie schon vorher beschrieben [77] und der Assay zeigte Linearität während 30 Minuten bei 37°C.

Die Phenylalanin-4-Monooxygenase ist ein Eisenprotein mit einem Atom proteingebundenem Fe^{II} pro 50'000 Daltons-Subeinheit [72]. Das Enzym besitzt weniger als ein Mol. Phosphat pro Mol. Enzym. Der Verlust des Phos-

phats kann während des Reinigungsprozesses stattfinden [78]. Es wurde postuliert, dass die Regulierung der Phenylalanin-4-Monooxygenase Synthese im Organismus über Phosphorylierung/Dephosphorylierung geschieht [79]. Letztlich wurde das phosphorylierbare Zentrum im Enzym charakterisiert und seine Aminosäuresequenz bestimmt [80]. Die bakterielle Monooxygenase besitzt ein Molgewicht von ca. 60'000 [81].

Stimulierung: Es sind mehrere Verbindungen getestet worden, die anscheinend eine stimulierende Wirkung auf die Aktivität des Enzymes ausüben können. Es muss jedoch bemerkt werden, dass die Isolierungs- und Reinigungs-Verfahren für dieses Enzym Schritte beinhalten, die sehr oft für die Entfernung solcher Verbindungen verantwortlich gemacht werden können. Die darauffolgende Zumischung der entfernten Spezies verursachte dann erwartungsgemäss eine scheinbare Aktivitätserhöhung des Enzyms. Dies kann zum Beispiel bei Kaufman [82] der Fall sein, der eine Ethanol-Ausfällung angewendet hat und dann eine Stimulation durch das Detergent Lysolecithin feststellen musste. 1970 hat Kaufman [24] eine stimulierende Substanz gefunden, kurz PHS (Phenylalanine-4-Hydroxylase-stimulator) genannt, und sie dann später [83,84] als ein Protein mit einem Molgewicht von 51'500 isoliert. Dieses Protein konnte bereits in katalytischen Mengen bei pH 8,0 und in Gegenwart des Tetrahydrobiopterins die Hydroxylierung durch das Enzym beschleunigen. Es ist vom Cofaktor-regenerierenden System vollkommen unabhängig und scheint direkt auf die Monooxygenase zu wirken, was auch die Aenderung des pH-Optimums für das Enzym erklärt. Es wird postuliert, dass das PHS die Assozierung des Enzyms zu weniger aktiven Formen verhindert.

Auch das schon erwähnte Phospholipid-Lysolecithin und das als proteolytisch-wirksam bekannte α -Chymotrypsin stimulieren ca. 20 bis 50-fach die Aktivität der Phenylalanin-4-Monooxygenase in Gegenwart von Tetrahydrobiopterin [85], wobei das Lysolecithin reversibel und das α -Chymotrypsin irreversibel wirkt. Mit Lysolecithin behandelt, akzeptiert das Enzym auch L-Tyrosin als Substrat. Ausserdem verliert sich die Spezifität des Enzyms insofern, als es aus L-Phenylalanin auch ca. 5% m-L-Tyrosin produziert. Auch andere Substrate wie Methionin, Norleucin, m-L-Tyrosin und D-Phenylalanin werden akzeptiert [86]. Die hepatische Phenylalanin-4-Monooxygenase wird durch Corticosteroide beeinflusst, vielleicht sogar reguliert [87]. Die Reaktion auf die grossen Dosen von exogenem Cortisol oder Corticosteron tritt bei erwachsenen Ratten "in vivo" nach ca. 24 Stunden als 40%-ige Enzymaktivitätssteigerung auf. Die Vorbehandlung der Tiere mit Cycloheximid (ein bekannter Corticosteroid-Antagonist), hebt die Wirkung der Corticosteroide auf.

Der hypobare Stress (0,5 atm) verursacht nach 24 Stunden bei den Ratten eine 60%-ige Enzymaktivierung, die durch die Cycloheximid-Wirkung vollkommen aufgehoben werden kann. Bekannterweise wirkt der niedrige Druck auf den Stoffwechsel des Noradrenalins durch die Stimulierung des sympathoadrenalen Systems. Nebst Phenylalanin-4-Monooxygenase wird auch die Tyrosin-Aminotransferase (EC 2.6.1.5) dadurch beeinflusst [88,11].

Nach Brase et al. [19] erhöht die Anwesenheit von ca. 8%-igem Ethanol (oder auch anderer kurzkettiger Alkohole) die Aktivität des Enzyms, möglicherweise durch die Herabsetzung der Aktivierungsenergie der enzymatisch katalysierten Reaktion. Dieser Einfluss ist bei niedrigen Temperaturen besonders hoch.

Hemmung: Weitere Forschungen [89,90] zeigten, dass das Enzym eine Polypeptidkette besitzt, die seine Wirkung zum Teil inhibiert. Die Entfernung dieser Kette - sei es durch die Detergentaktion (Lysolecithin)-reversibel, sei es durch die irreversible proteolytische Abspaltung (α -Chymotrypsin), erhöht eindeutig die Enzymaktivität. Die gleiche Wirkung kann man auch durch Einführung der negativen Ladungen (z.B. bei der Phosphorylierung) ins Enzym, also durch die Verstärkung der elektrostatisch abstossenden Kräfte, erzielen.

Eine stereospezifische kompetitive Hemmung konnte "in vitro" ausschliesslich für das 4-Chlor-L-phenylalanin festgestellt werden. Das 4-Chlor-D-phenylalanin übte keine hemmende Wirkung auf die Phenylalanin-4-Monooxygenase-Aktivität aus [91]. Nach Koe et al. [92] verursacht die Behandlung mit 4-Chlor-phenylalanin eine Abnahme des Serotonins im Gehirn.

"In vivo" eine einfache Dosis (360mg 4-Chlor-phenylalanin pro Kilogramm Körpergewicht) der Ratte verabreicht, ergab nach 24 Stunden einen irreversiblen Verlust von 90% der Enzymaktivität [93]. Diese letzte Beobachtung wurde von Greengard et al. [94] als nicht zutreffend befunden. Bei sechstägigen Ratten und auch bei erwachsenen Tieren konnten sie 24 Stunden nach Vorbelastung mit 4-Chlor-phenylalanin mittels einer Injektion von Phenylalanin nach 9 Stunden eine 2,5-fache Erhöhung der Enzymaktivität messen. Hingegen zeigten die Ratten, denen keine vorangehende Dosis 4-Chlor-phenylalanin verabreicht wurde, keinerlei Wirkung des Phenylalanins auf die Enzymaktivität. Cortisol ergab bei sechstägigen Tieren eine ca. 4-fache Aktivitätssteigerung ohne jeglichen Einfluss des kompetitiven Hemmers. Bei der 4-Chlor-phenylalanin-Vorbehandlung wirkten sich die Einflüsse des zusammen gegebenen Phenylalanins und Cortisols additiv aus.

Die Phenylalanin-4-Monooxygenase aus der Kultur der Hepatomazellen H 4-II-E-C-3 [25] wurde auch durch das 4-Chlor-phenylalanin gehemmt, was

insofern interessant ist, als nach Haggerty et al. [37] die kinetischen Eigenschaften dieses Enzyms mit denjenigen für das hepatische Enzym identisch wären. Man könnte also das schwerer zugängliche hepatische Enzym in vielen Untersuchungen durch das Hepatoma-Enzym ersetzen.

Auch die Tryptophan-5-Monooxygenase wird durch das 4-Chlor-phenylalanin inhibiert, was durch die direkte Wechselwirkung zwischen dem Inhibitor und den Hepatozyten verursacht wird [25].

Die Phenylalanin-4-Monooxygenase braucht nach dem Absetzen des 4-Chlor-phenylalanins volle 48 Stunden, um sich wieder zu "erholen" und die volle ursprüngliche Aktivität wieder zu erlangen. Ähnlich wie in "in vivo" Experimenten, stimuliert das Hydrocortison trotz Gegenwart des 4-Chlor-phenylalanins das Enzym weiter.

Auch das Esculin (6,7-Dihydroxy-cumarin-6-glucosid) inhibiert das Enzym "in vivo" bei Ratten, wobei es mit dem Tetrahydropterin-Cofaktor kompetiert [95]. Der inhibierende Einfluss des Melanins [96] gilt nur für die Phenylalanin-4-Monooxygenase, die Tyrosin-3-Monooxygenase wird durch diese Verbindung sogar aktiviert.

Das β -2-Thienyl-DL-alanin wirkt inhibierend sowohl "in vivo" wie auch "in vitro" [97], wobei nicht nur die K_m -Konstante für das Phenylalanin 30-fach höher wird, sondern auch die intestinale Absorption kompetitive gehemmt ist.

Epigenetische Enzymproduktion: Eine Möglichkeit der epigenetischen Enzymproduktion durch die erythroleukämischen Zellen der Maus, die normalerweise nicht imstande sind, die Phenylalanin-4-Monooxygenase herzustellen, wurde von Gopalakrishnan et al. [98] publiziert. Diese Forscher fanden, dass die Cytoplasten der Rattenhepatomazellen eine solche Produktion bei den obenerwähnten Zellen hervorrufen können.

Stabilität: Die Stabilität der gereinigten Phenylalanin-4-Monooxygenase lässt sehr viel zu wünschen übrig. Sie wurde in verschiedenen Versuchen bestimmt und z.B. von Weber et al. [12] wie folgt beschrieben:

bei -4°C nach 24 Stunden gemessen	- 80% Aktivitätsverlust
bei -10°C nach 48 Stunden gemessen	- 50% Aktivitätsverlust
bei -70°C anaerob, nach 2 Monaten gemessen	- 20% Aktivitätsverlust

Die maximale Stabilisierung (bei -70°C) kann durch die Zugabe der Katalase, eines Radikalfängers (wie z.B. 3,5-Di-t-butyl-4-hydroxybenzylalkohol), des TAPS (Tris(hydroxymethyl)-methylaminopropansulfonsäure)-Puffers und durch Einhaltung der anaeroben Lagerungsbedingungen erreicht werden. Die optimale

Stabilisierung wurde durch Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff (also bei -196°C) gewährleistet [99].

In der intakten Leber wurde das Enzym bisher nur selten untersucht. Youdim et al. [100] haben durch Perfusion der Rattenleber mit 5mM Glucose und 0.30mM L-Phenylalanin die Michaelis Konstante K_m zu $1,5 \times 10^{-3}\text{M}$ ermittelt, was mit einigen Werten für Leberpräparate übereinstimmt (siehe Tabelle III). Gleichzeitig konnten sie auch eine totale Hemmung des Enzyms durch das intraperitoneal zugefügte 4-Chlor-phenylalanin bestätigen. Bei höheren Konzentrationen des L-Phenylalanins wurde jedoch diese hemmende Wirkung vollkommen aufgehoben, was für die Kompetitivität der Inhibition spricht.

Substrate, die durch die Phenylalanin-4-Monooxygenase akzeptiert werden, sind durch mehrere Forscher untersucht worden. Schon 1952 wurde bekannt [6], dass folgende Verbindungen durch dieses Enzym nicht hydroxyliert werden: D-Phenylalanin, N-Acetyl-L-phenylalanin, N-Chloracetyl-L-phenylalanin, L-Phenylalanin-ethylester, DL-Phenylglycin, Phenylserin, Phenylbrenztraubensäure, Phenylethylamin, Benzoesäure, Hippursäure, Zimtsäure und Mandelsäure. Nach Kaufman [101] entsteht aus 4-Chlor-phenylalanin ca. 1,7% der Tyrosin-Menge, die durch Hydroxylierung von L-Phenylalanin gebildet wird. 2-Fluor-L-phenylalanin und 3-Fluor-L-phenylalanin können als Substrate wirken, 4-Fluor-L-phenylalanin bildet das L-Tyrosin als einziges Produkt (nur 16,7% der Menge die aus L-Phenylalanin entsteht). Es konnte kein Migrationsprodukt (nach "NIH-Shift") festgestellt werden [56]. Neben L-Phenylalanin wird auch L-Tryptophan durch das Enzym hydroxyliert [102]. Für die 4-substituierten Phenylalanine muss noch der NIH-Shift in Erwägung gezogen werden (siehe Kapitel 1.2.1).

Die Produkte der enzymatischen Hydroxylierung des L-Phenylalanins wurden sorgfältig untersucht. Mit Rattenleberenzym konnte man nur p-Tyrosin feststellen [17]. Rattenhirn-Homogenat ergab ein Gemisch von 80% p-Tyrosin und je 10% m- und o-Tyrosin [27]. Auch Rindernebennierenpräparate zeigten die Bildung von m-Tyrosin als Nebenprodukt zum p-Tyrosin [103].

Nair et al. [104] hat aus Spinatblättern ein Enzym isoliert, das die Hydroxylierung des L- β -Phenylalanins zum L- β -Tyrosin katalysiert. Dieses Enzym besitzt die höchste Aktivität bei pH 4,2 in Gegenwart von NADH (NADPH oder Ascorbinsäure) und Tetrahydrofolsäure.

Tabelle III : Kinetische Daten für Phenylalanin-4-Monooxygenase

Publikation	Apparent K_m - Werte			
	für L-Phenylalanin		für	
	6,7-Me ₂ THPt als Cofaktor	andere Cofaktoren	6,7-Me ₂ THPt	Andere Cofaktoren
<u>Rattenleber - Enzym</u>				
Ayling [9]	-	-	$9,3 \times 10^{-5}M$	$2,2 \times 10^{-5}M$ THBPt $1,3 \times 10^{-4}M$ THPt $1,3 \times 10^{-4}M$ 4-Amin- -6,7-Me ₂ THPt
Bublitz [10]	$1,12 \times 10^{-3}M$	-	$6,7 \times 10^{-5}M$	
Namoodiri [88]	$5,0 \times 10^{-4}M$	-	$1,6 \times 10^{-4}M$	
Weber [12]	$1,3 \times 10^{-3}M$	$1,3 \times 10^{-3}M$ THBPt	$4,3 \times 10^{-4}M$	$5,2 \times 10^{-5}M$ THBPt
Christensen [14]	$1,0 \times 10^{-4}M$	-	$1,0 \times 10^{-3}M$	
Nakata [15]	$1,92 \times 10^{-3}M$ $1,43 \times 10^{-3}M$	$7,2 \times 10^{-4}M$ 6-MeTHPt $4,5 \times 10^{-4}M$ "	$4,4 \times 10^{-5}M$ $3,4 \times 10^{-5}M$	$3,7 \times 10^{-5}M$ 6-MeTHPt $4,5 \times 10^{-5}M$ "
La Du [16]	$1,4 \times 10^{-4}M$			
Mitoma [17]	$2 \times 10^{-4}M$	-	-	$3,5 \times 10^{-6}M$ SepiaPt
Brase [19]	$9,3 \times 10^{-4}M$ $3 \times 10^{-4}M$ (+EtOH)	- -	$6,1 \times 10^{-5}M$ $1,3 \times 10^{-4}M$ (+EtOH)	
Tourian [20]	$1,75 \times 10^{-3}M$ akt.	-	-	-
Guroff [81]	$3 - 7 \times 10^{-4}M$	-	$5 \times 10^{-4}M$	-
Bailey [113]	-	-	-	$3 \times 10^{-6}M$ 6- β -THPt $1 \times 10^{-4}M$ 2,5,6-Tria- aminyrimidinon-4 $3 \times 10^{-6}M$ 5-Benzyla- min-2,6-diaminpyri- midinon-4
Haggerty [37]	$3,0-5,75 \times 10^{-4}M$	-	$1,1-1,4 \times 10^{-4}M$	
Kaufman [33]	$1,1 \times 10^{-3}M$	$1,5 \times 10^{-4}M$ THBPt max	$5,7 \times 10^{-5}M$	$4,5-6 \times 10^{-6}M$ THBPt $4,5 \times 10^{-5}M$ 6-MeTHPt $6 \times 10^{-5}M$ 7-MeTHPt $4 \times 10^{-6}M$ SepiaPt [23] $3,3 \times 10^{-4}M$ 2,5,5-Tri- aminpyrimidinol-4
Kaufman [114]	-	-	-	
<u>Andere Enzymquellen</u>				
Kaufman [33] menschl. Leber	$1 \times 10^{-3}M$	-	$5,7 \times 10^{-5}M$	
Tourian [32] Mäuseleber	$2,4-6,2 \times 10^{-4}M$	-	-	-
Cotton [28] Affenleber	$4 - 8 \times 10^{-4}M$	-	$8 - 9 \times 10^{-5}M$	-
Guroff [26] <i>Pseudomonas</i> sp	$4 \times 10^{-4}M$	-	$3 \times 10^{-4}M$	-

Die Altersabhängigkeit der Enzymproduktion in der foetalen Rattenleber wurde für die Phenylalanin-4-Monooxygenase, die Dihydropteridin-Reduktase, die Sepiapterin-Reduktase (EC 1.1.1.153) und die Dihydrofolat-Reduktase (EC 1.5.1.3) mittels [^{14}C]-Phenylalanin, [^3H]-Phenylalanin und [^{14}C]-Tyrosin genauer untersucht [105]. Die Ratten wurden ab dem zehnten Gestationstag getestet. Der Assay wurde während 60 Minuten bei 25°C im Dunkeln durchgeführt. Am zwanzigsten Gestationstag konnten die folgenden Werte gemessen werden:

Konzentration des THPT-Cofaktors	= 6%	des Wertes für erwachsene Tiere					
Aktivität der Phe-4-Monooxygenase	= 0%	"	"	"	"	"	"
" " DHPteridin-Reduktase	= 50%	"	"	"	"	"	"
" " Sepiapterin-Reduktase	= 80%	"	"	"	"	"	"
" " DHFolat-Reduktase	= 50%	"	"	"	"	"	"

Auch die neugeborenen zwei Stunden alten Ratten zeigten noch erniedrigte Werte für die oben genannten Enzyme. Es scheint, dass die Enzymsysteme einen Reifungsprozess durchmachen müssen, womit die Früherkennung der Abweichung von den Normalwerten ausgeschlossen wäre.

Auch auf diesem Gebiet gibt es jedoch sich widersprechende Angaben. Del Valle et al. [106] haben nämlich für einen 22-tägigen Foetus eine maximale Aktivität der Phenylalanin-4-Monooxygenase von 50% der Erwachsenenaktivität gemessen und dabei alle drei existierenden Isozyme (mit überwiegend 87% ν -Isozym) identifiziert.

Die Herstellung des fixierten Enzyms als Möglichkeit der Stabilisierung der Phenylalanin-4-Monooxygenase, was gleichzeitig als hoffnungsvoller Weg zur Behandlung der Phenylketonurie-Patienten erschien, war das Ziel von mehreren Arbeiten der letzten Jahre. Die Idee war, eine fixe Matrix (z.B. aus Polyacrylamid) herzustellen, die das Enzym genügend binden und stabilisieren, dabei aber seine katalytische Wirkung nicht beeinträchtigen würde. Weiss et al. [107] erreichten eine 35%-ige Bindung des Enzyms an der Matrix, die Stabilität war jedoch nicht zufriedenstellend. Auch weitere Arbeiten, mit CH-Sepharose 4B [108] AH-Sepharose 4B, Alginsäure und Polygalacturonsäure [109], sowie CN-Sepharose 4B [110] oder mit aktivierter Thiol-Sepharose 4B [111] ergaben bisher keine befriedigenden Resultate.

Die nichtenzymatische Hydroxylierung des L-Phenylalanins zum L-Tyrosin bei assayähnlichen Bedingungen wurde nach Viscontini auch noch weiter untersucht [112]. Man hat (wie erwartet) dabei keine Stereospezifität für das L-Epimer feststellen können. Das Produktverhältnis betrug: o-Tyrosin/m-Tyrosin/p-Tyrosin 2 : 3 : 1. Die entstehenden Mengen Tyrosins waren in

der Größenordnung von ca. 30 nMol pro ml Gemisch (bestehend aus 10mM L-Phenylalanin, 0,5mM 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, 5mM Dithiothreitol, 0,8mM NADH, 5mM Nicotinamid und 0,2M Natriumphosphatpuffer pH 6,8). Es wurde gleichzeitig festgestellt, dass Katalase (915 Einheiten pro ml Gemisch), Dithiothreitol oder Mercaptoethanol (mehr als 5mM) eine nicht-enzymatische Hydroxylierung stoppen.

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Die Untersuchungen des Phenylalanin-4-Monooxygenase Systems, dessen partielle oder totale Unwirksamkeit für eine Reihe von Erkrankungen verantwortlich ist, wurden als Hauptthema dieser Arbeit festgelegt. Dank den Fortschritten, die von der Forschungsgruppe unter der Leitung von Professor Viscontini bei der regiospezifischen Synthese von neuen Pterinen erreicht wurden, hat sich die Möglichkeit eines Studiums der (Pterin-Cofaktor-Struktur/Enzymaktivität der Phenylalanin-4-Monooxygenase)-Abhängigkeit ergeben. Die somit erhaltenen enzymatisch-kinetischen Daten könnten für die wirksame Behandlung der durch Cofaktor-Mangel verursachten Erkrankungen wegweisend sein.

Die vorgeschlagenen Untersuchungen sollten mit gereinigtem Rattenleberenzym durchgeführt werden. Dabei musste eine spezifische Messmethode für die Enzymaktivität, sowie eine Nachweismethode zur quantitativen Bestimmung der entstehenden Produkte ausgearbeitet werden.

Die gewonnen Erkenntnisse sollten für klinisch-diagnostische Zwecke angewendet werden und dadurch eine differenzierte Festlegung des Zusammenhangs zwischen der Erkrankung und der mangelnden Komponente des Enzymsystems der Phenylalanin-4-Monooxygenase ermöglichen.

Diese Arbeit wurde in vier Kapitel unterteilt:

1. Ausarbeitung der analytischen Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Enzym : Coenzym-Aktivität; spektrophotometrische Methoden; gaschromatographische Verfahren zur Trennung und Bestimmung von aromatischen Aminosäuren -- Synthese und Auswahl der geeigneten Derivate; Synthese von deuteriertem Phenylalanin und Tyrosin als interne Standards; quantitative Bestimmung der entstehenden Produkte mittels Gaschromatographie - Massenspektrometrie.

2. Isolierung und Reinigung der Phenylalanin-4-Monooxygenase und Vergleich verschiedener Methoden.
3. Enzymatisch-kinetische Untersuchungen mit von Herrn Professor Dr.M.Viscontini zur Verfügung gestellten reinen Pterin-Derivaten.
4. Aktivitätsbestimmung der Phenylalanin-4-Monooxygenase für klinisch-diagnostische Zwecke.

Diese Arbeit wurde im medizinisch-chemischen Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik durchgeführt und im Sommer 1981 abgeschlossen.

2. ANALYTISCHE METHODEN

2.1 Theoretischer Teil

Um eine optimale Zusammensetzung der Proben ermitteln zu können, musste man einerseits auf die Literatur zurückgreifen um einen ersten Versuch zu starten, andererseits jedoch hiess es, die publizierten und so verschiedenen Angaben (siehe Tabelle I) zu überprüfen und den besten Assay herauszusuchen. Man hat bewusst nach einer einfacheren Komposition Ausschau gehalten, da es von vornherein klar war, dass eine ideale Nachahmung der Naturvorgänge, also sozusagen die Verwirklichung eines metabolischen Schrittes im Reagenzglas ("in vitro") nicht möglich ist.

Auf Grund der sorgfältigen Literaturstudien konnte man manche der angewendeten (siehe Tab.I) Assaykomponenten "a priori" ausschliessen.

Glucose und Glucose-Dehydrogenase zum Beispiel, die von Kaufman [23,24,25] zur Regenerierung des NADPH eingesetzt worden sind, wurden durch Nielsen [18] als unbedingte Komponenten des Assays in Frage gestellt. Die Wirkung der Dehydrogenase wurde der Verunreinigung mit Katalase, die im Dehydrogenasepräparat vorhanden war, zugeschrieben.

Katalase. Durch die Zugabe reiner Katalase konnte die Aktivität des Enzyms deutlich erhöht werden [18]. Diese Wirkung bezieht sich vor allem auf das in der Gegenwart von Ascorbinsäure oder anderen Reduktionsmitteln bei der aeroben Oxidation des Cofaktors entstehende Peroxid. Durch ihre Anwesenheit wird also die reduzierte Form des Cofaktors geschützt. Die komplette Entfernung der Katalase (nach einem Spezialverfahren [12]) aus dem Enzympräparat verursachte einen totalen Aktivitätsverlust der Phenylalanin-4-Monooxygenase.

Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel im Assay bewirkt keine Hemmung des Enzyms und kann sowohl die Dihydropteridin-Reduktase, wie auch das NADPH im Assay ersetzen, indem es die nicht-enzymatische Regenerierung des Tetrahydropterin-Cofaktors (durch die Reduktion des chinoiden Dihydropterins [115]) bewirkt. Das DTT interferiert nicht mit der Farbkomplexbildung bei der 1-Nitroso-2-naphthol Methode. Auch der Schutz von Peroxiden wird durch das DTT gewährleistet [9].

Die Arbeiten von Loechler et al. [116,117,118] haben die mechanistischen und kinetischen Untersuchungen der Reduktion der chinoiden Formen von Flavinen mittels DTT beschrieben. Das allgemeine Reaktionsschema für das

Dithiothreitol kann man folgendermassen darstellen:

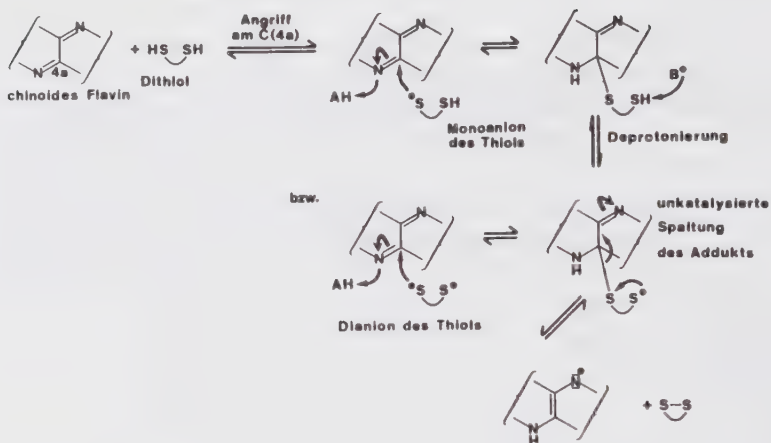


Abb.9 Reduktion der chinoiden Flavine durch Dithiol

Sowohl der Angriff am C(4a), als auch die Spaltung des Dithio-Flavin-Addukts sind geschwindigkeitsbestimmend. Der Vergleich der Wirkung des Dithiothreitol (DTT) und des Dithioerythritols (DTE) fiel zu Gunsten des DTT aus. Da die beiden Diastereomere je zwei identische pK_1 -Werte besitzen ($\text{pK}_1 = 9,14$ / $\text{pK}_2 = 9,94$) muss man die Wirkung der beiden als identisch beschreiben. Bei der Spaltung des Addukts sind sie jedoch verschieden. Der Ringschluss des DTT bringt in keinem Fall eine sterische Hinderung mit sich und geschieht gleich leicht von der Wannen- wie von der Sessel-Form. In der Wannenform des DTE dagegen stören sich die ekliptischen Hydroxyle gegenseitig und verlangsamen den Ringschluss und damit diese Reaktionsstufe, die wie schon erwähnt, zum Teil geschwindigkeitsbestimmend ist. Somit ist eine schlechtere Reaktionsfähigkeit des Dithioerythritols für das chinoides Flavin und "per analogiam" für das chinoides Dihydropterin zu erwarten.

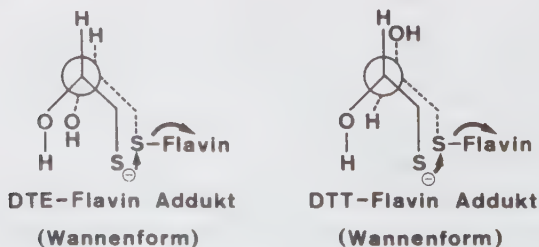


Abb.10 Sterische Struktur der Flavin-Addukte mit DTE bzw. DTT

Empirisch konnte man eine ca. 7-fach schnellere Wirkung des DTT im Vergleich mit dem DTE messen.

Inkubationszeit: Im Bezug auf die Inkubationszeiten haben Milstien et al. [119] eine lineare Zeitabhängigkeit des Assays bei 25°C bis 60 Minuten festgestellt. Zannoni [13] fand den linearen Verlauf der Aktivitätskurve bei 37°C bis mindestens 30 Minuten gewährleistet.

Aktivierung: Die Aktivierung des Enzyms durch eine Vorinkubation in Gegenwart von L-Phenylalanin ist sowohl von dessen Konzentration, als auch von der Temperatur abhängig. Sie wurde bereits 1969 von Nielsen als für die Startgeschwindigkeit der Phenylalanin-4-Monooxygenase verantwortlich beschrieben [18]. Ohne diese Aktivierung wird eine Verzögerung in der Wirkung des Enzyms, ein sogenanntes "lag period", beobachtet, wenn die Inkubationstemperatur unterhalb 30°C liegt.

Der Beitrag von Shiman et al. [21] versucht das Phänomen der Aktivierung durch das L-Phenylalanin quantitativ zu erfassen. Am wahrscheinlichsten liegt dieser Aktivierung eine Konformationsveränderung des Proteins, genauer genommen seiner quaternären Struktur, zugrunde, was die zugängliche Oberfläche des Enzyms beeinflusst. Die beobachteten Veränderungen, sowohl der katalytischen Eigenschaften, wie auch der Adsorptionsfähigkeiten (hydrophobe Chromatographie) des Enzyms, sind vollkommen reversibel und scheinen durch den geschwindigkeitsbestimmenden Konformationswechsel bestimmt zu sein. Die Aktivierung ist ein "Alles oder Nichts"-Prozess, d.h., alle Subeinheiten des Enzymmoleküls sind gleichzeitig aktiv oder inaktiv. "Gemischte" Zustände kommen nicht vor.

Durch die Aktivierung wird die "lag period" des Enzyms aufgehoben. Die Startgeschwindigkeit ist tangential zur Kurve, die das Fortschreiten des Assays beschreibt. Die Temperaturabhängigkeit der Aktivierung ist sehr gross und die Geschwindigkeitskonstante erhöht sich pro 10°C ca. 7,2 mal, was der Arrhenius-Aktivierungsenergie von 33,5 kcal/Mol. entspricht. Zum Vergleich: Die Hydroxylierungsgeschwindigkeitskonstante erhöht sich nur 2,6 mal pro 10°C (Arrhenius-Aktivierungsenergie von 12 kcal/Mol.).

Nach Tourian [20] wird bei dieser Aktivierung aus den inaktiven Dimeren (MG: 110'000) ein aktives Tetramer des Enzyms mit dem Molgewicht 177'000 gebildet. Diese Hypothese kann jedoch mit den folgenden Tatsachen nicht in Einklang gebracht werden:

- das isolierte, nicht aktivierte Enzym ist bereits ein Tetramer
- die Geschwindigkeit der Aktivierung ist genau 1-er Ordnung und die Änderung der Enzymkonzentration hat keinen Einfluss auf die Geschwindigkeits-

konstante der Aktivierung.

- die gemessene Konstante liegt tiefer als diejenige für die Dimerisierung.

Es ist möglich, dass dieser Aktivierungsprozess der Phenylalanin-4-Monooxygenase auch physiologisch von Bedeutung ist. Ein direkter Beweis fehlt jedoch. Erstaunlicherweise wird das Enzym aber bei pH 7,4 durch 0,06mM L-Phenylalanin (normales Niveau im Rattenplasma) zu ca. 50% aktiviert.

Es stellt sich nun noch die Frage nach der Identität oder Verschiedenheit des Aktivierungszentrums ("activation site") und des katalytischen Zentrums ("catalytic site") des Enzyms. Dieses Problem wurde durch Shiman [120] untersucht. Es hat sich herausgestellt, dass pro Subeinheit des katalytisch aktiven Enzyms ein Aktivierungszentrum vorkommt. Somit besitzt ein Molekül der aktiven Phenylalanin-4-Monooxygenase (Tetramer) vier Aktivierungszentren, die voneinander unabhängig sind. Die Aktivierung des ersten Zentrums ist nach dem Modell von Koshland et al. [121] thermodynamisch am ungünstigsten. Gleichzeitig konnte man die Nichtidentität des Aktivierungszentrums mit dem katalytischen Zentrum festlegen. L-Tryptophan wird sehr wohl als Substrat (für das Letztere), nicht aber als Aktivator (für das Erste) akzeptiert. Das bereits erwähnte Lysolecithin (siehe S.22), das auf die Enzymaktivität stimulierend wirkt, rivalisiert nicht mit dem L-Phenylalanin um das Aktivierungszentrum. Es ist noch immer nicht klar, ob L-Phenylalanin im Aktivierungszentrum während dem katalytischen Zyklus gebunden bleibt oder freigesetzt wird.

Puffersysteme: Als wichtigster Schritt schien danach die richtige Wahl des Puffers, da sich bisher fast jede Publikation auf einen anderen Puffer gestützt hat, und die Bevorzugung jenes Puffers nie experimentell belegt wurde. Ausserdem musste auch die Rolle des Puffers angezweifelt werden, wenn beim angewendeten TRIS-Puffer (pH 8,7) das gemessene pH des Assays mit 7,5 angegeben wurde [28]. Aus diesen Gründen hat man eine ganze Reihe der bekannten und für biochemische Zwecke benutzte Puffersysteme auf ihren Einfluss auf die Aktivität der Phenylalanin-4-Monooxygenase untersucht. Einige Bemerkungen zu den "Good's"-Puffern sind hier angebracht [122]. Zu dieser Gruppe gehört eine Reihe zwitterionischer Substanzen, deren Vorzüge für biochemische Zwecke eindeutig sind. Die pH-Werte werden nur minimal durch die Temperatur oder ionische Zusammensetzung des Mediums beeinflusst. Sie sind chemisch stabil, in keine metabolischen Prozesse involviert und bilden mit bivalenten Kationen keine Komplexverbindungen. Ihre Lösungen können sehr konzentriert gemacht werden, wobei sie für den UV-Bereich des Lichtspektrums durchlässig sind.

Synthese der GC-Derivate: Als Erstes musste man das Problem der am besten geeigneten Derivate lösen. Diese mussten folgende Kriterien erfüllen: möglichst einfache Synthese (ohne Veränderung der Grundstruktur), Ausbeute über 95%, keine Verluste bei vermindertem Druck, Stabilität in Temperatur und Zeit, Erhöhung der Flüchtigkeit der Ursprungsverbindung (Verkürzung der Retentionszeit) und keine, oder nur minimale Reaktionsfähigkeit mit der Ausgangssubstanz selbst oder dem Säulenmaterial [123] .

Synthese der internen Standards: Aus verschiedenen Gründen ("NIH-Shift", klinische Tests) war es von Interesse eine spezifische Bestimmung von L-Phenylalanin und L-Tyrosin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie und Massenfragmentographie (SIM=Selected Ion Monitoring) auszuarbeiten. Zu diesem Zweck war es nötig, mit stabilen Isotopen markierte Verbindungen als interne Standards herzustellen. Aus den publizierten Daten konnte man eine spezifische Deuterierung zu 6-[^2H]-Tyrosin durcharbeiten [124,125].

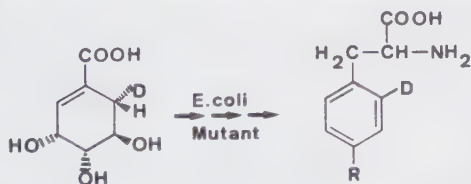


Abb.11 Synthese des 6-[^2H]-Tyrosins aus 6 α -[^2H]-Shikimisäure

Diese stereospezifische trans-1,4-Elimination ergäbe jedoch 6-[^2H]-Phe (wenn R=H) oder 6-[^2H]-Tyr (wenn R=OH) und würde die Labels an das weniger interessante C(6)-Atom des Rings bringen.

Auch die perdeuterierten Aminosäuren [126,127], die biologisch in Algenkulturen (*Scenedesmus obliquus*; *Chlorella vulgaris*) hergestellt werden, waren nicht das gewünschte Produkt. Das betrifft ebenso das α -deuterierte Phenylalanin [128,129]. Der historisch bekannte Austausch des Cl-Atoms durch katalytische Deuterierung, in dem aus Benzoylchlorid aufgrund der

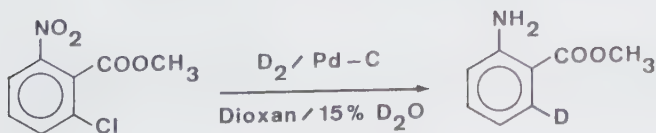


Abb.12 Katalytische Deuterolyse von 2-Nitro-6-chlor-benzoesäure-methylester

Rosenmund Reduktion der Benzaldehyd-d synthetisiert wurde, zeichnete sich als möglicher Weg ab [130]. Usmehr, als nach McCubbin et al. [131] bei der Reduktion der Nitrogruppe im 2-Nitro-6-chlor-benzoesäure-methylester gleichzeitig das Chlor durch Deuterium ersetzt wird (Abb.12). Man hat sich für folgende Synthesewege entschieden:

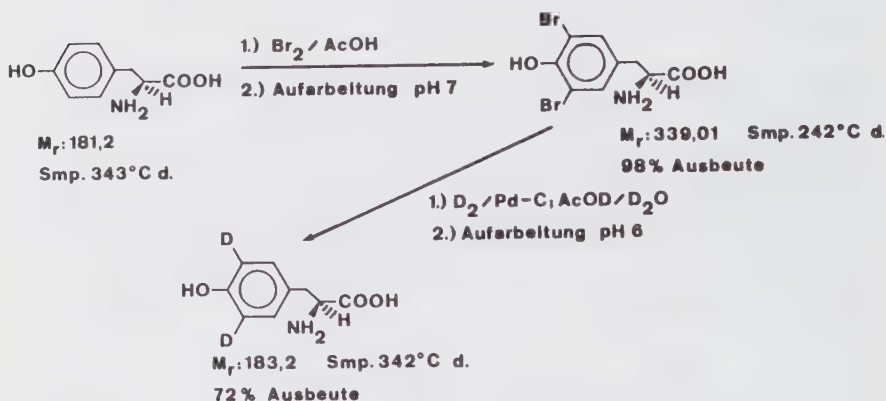


Abb.13 Durchgeführte Synthese von 3,5- $[\text{H}^2]_2$ -L-Tyrosin

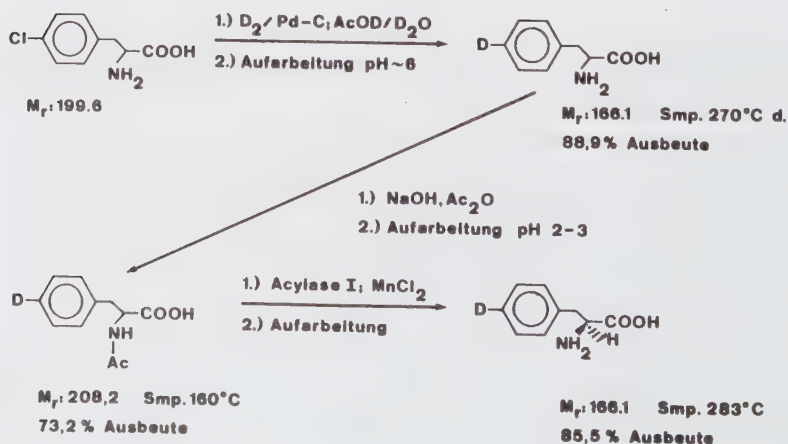


Abb.14 Durchgeführte Synthese von 4- $[\text{H}^2]$ -L-Phenylalanin

2.2. Experimenteller Teil

2.2.1 Optimale Zusammensetzung des Enzym-Assays

Die Enzymlösung wurde nach der Vorschrift von Cotton [135] (da die Shiman-Arbeiten [21,22] damals noch unbekannt waren) für den "crude extract" vorbereitet. Von der Originalarbeit wichen wir insofern ab, als wir Rattenleber (Albinoratten Zbz Zucht), anstatt Leber des Cynomolgus Affen (Macaca irus) verwendet haben. Sämtliche Arbeiten wurden bei +4°C durchgeführt. Die sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefrorenen Rattenlebern wurden im Kühlraum aufgetaut, zerkleinert und dann mit einem Homogenisierungsgerät (Braun) 30 Sekunden bei halber Geschwindigkeit und weitere 30 Sekunden bei voller Geschwindigkeit in 0,1M Tris-HCl Puffer pH 8,6 (4 ml Puffer/1 g Leber) homogenisiert. Das Homogenat wurde mit einer Kühlzentrifuge (Sorvall, Typ Superspeed RC 2-B mit SS-34 Rotor, $R = 4,25$) bei +4°C während 60 Minuten bei $17'400 \times g$, (d.h. $12'000 \text{ rpm}$) zentrifugiert. Der Ueberstand, zuvor über Gaze filtriert (um Lipide zu entfernen), wurde als "Enzymlösung" ("crude extract") weiterbenutzt und bei -20°C (portionenweise eingefroren) gelagert. Das Reaktionsgemisch für den "Enzym assay" nach Cotton setzte sich wie folgt zusammen: 4mM L-Phenylalanin / 2mM Dithiothreitol / 0,02M Tris-HCl Puffer pH 8,7 und 0,5mM 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin.

Tyrosinbestimmung. Das Totalvolumen der einzelnen Proben, das bei Cotton [28] 0,5 ml betrug, wurde auf 1 ml vergrößert. Die Lösungen wurden in Glasröhrchen pipettiert, mit Magnetstäbchen versehen und 1 Minute bei 37°C vorinkubiert (keine Aktivierung, aber die "lag period" wird dadurch eliminiert). Dann, nach Zugabe von 0,1 ml Enzymlösung wurde die Inkubation noch weitere 30 Minuten fortgesetzt. Zur Beendigung der Reaktion hat man 0,2 ml 4%-ige (G/V) 5-Sulfosalicylsäure zugegeben. Diese hat man Trichloressigsäure wegem dem weiterbeschriebenen gaschromatographischen Nachweis vorgezogen. Nach 10-minütigem Stehenlassen hat man die Proben 20 Minuten lang bei $2'000 \times g$ zentrifugiert und den Ueberstand für die Tyrosinbestimmung verwendet. In die nichtinkubierten Leerwertproben hat man zuerst das Deproteinisierungsmittel (5-Sulfosalicylsäure) und erst danach die Enzymlösung einpipettiert. In den Ueberständen konnte man das L-Tyrosin als Reaktions-

produkt quantitativ ermitteln. Die Bestimmung erfolgt zuerst nur durch Messung des fluoreszierenden Komplexes des Tyrosins mit dem 1-Nitroso-2-naphthol-Reagens (Modifikation der Methoden von Waalkes et al. [136] und Guzman Barron et al. [137]). Der spektrophotometrische Nachweis bei der Wellenlänge $\lambda = 450$ nm nach Udenfriend et al. [138] wurde dem fluorometrischen Nachweis vorgezogen, besonders nachdem ein Bericht veröffentlicht wurde, dass auch die tyrosylresthaltigen Peptide, z.B. das Tyrosyl-leucin, die gleichen Fluoreszenzbeiträge wie das Tyrosin selbst liefern [112]. Bei der Durchführung der kolorimetrischen 1-Nitroso-2-naphthol-Methode hat man einerseits die Angaben von Udenfriend [137] benützt, andererseits aber auch noch die Modifizierungen von La Du et al. [140] berücksichtigt.

Reagenzien:

- 0,2%-ige (G/V) 1-Nitroso-2-naphthol Lösung in 96%-igem EtOH,
- 3N HNO₃
- 0,1N NaNO₂
- Chloroform p.a.
- Wasser bidest.

Die Reagenzien wurden bei -4°C höchstens einen Monat lang aufbewahrt und erst kurz vor dem Gebrauch im Verhältnis 1-Nitroso-2-naphthol : HNO₃ : NaNO₂ 2 : 3 : 3 gemischt [141]. 0,6 ml dieses Farbreagenzes hat man dem gleichen Volumen des Ueberstandes aus dem "Enzym assay" zugesetzt und während 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 0,3 ml kaltes Wasser bidest. zugegeben und mit 2 ml Chloroform extrahiert, um den Ueberschuss an nicht reagiertem Farbreagens zu entfernen. Die wässrigen Phasen wurden nach dem Abzentrifugieren während 10 Minuten bei 2'000 x g abgetrennt und bei $\lambda = 450$ nm gegen den eigenen Leerwert aus dem "Enzyme assay" spektroskopisch gemessen. Gleichzeitig mitgeführte Kontrollproben enthielten anstelle des Enzyms bekannte Mengen Tyrosin und wurden durchgeführt, um die Richtigkeit der Eichkurve zu überprüfen. Der Nachweis dieser Methode liegt zwischen 0,0033 und 0,42mM Tyrosin in den flüssigen Ueberständen des "Enzym assay's". Als erstes hat man Stichproben durchgeführt, um die Notwendigkeit der angegebenen Assaykomponenten zu bestätigen. Man hat dazu im Assay jeweils auf eines der Reagenzien verzichtet. Tabelle (IV) zeigt die Ergebnisse dieser Testreihe. Somit wurde die angewendete Zusammensetzung der Proben bestätigt, d.h. keine der Komponenten hat sich als überflüssig erwiesen.

Tabelle IV: Einfluss der einzelnen Komponenten des "Enzym assay's" auf die resultierende Enzymaktivität.

Assaykomponente				E ₄₅₀	graphisch μmol Tyr / Assayprobe
L-Phe	Dithio- threitol	TRIS-Puffer pH 8,7	Cofaktor		
+	+	+	+	0,397	0,120
-	+	+	+	0,001	0
+	-	+	+	0,053	0,015
+	+	-	+	0,025	0,006
+	+	+	-	0,003	0,001
+	-	+	-	0,004	0,001
+	-	-	-	0,003	0,001

Puffersysteme: Es wurden folgende Puffer in Erwägung gezogen:

1. Boratpuffer - 0,1M ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{KCl}/\text{NaOH}$) - pH Bereich von 8,0 - 10,2 sogenannte "Clark and Lubs solutions" nach Bower et al. [142], aber ausgehend von 0,2M Lösungen.
2. Acetatpuffer - 0,1M ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) - pH Bereich von 3,7 - 5,6 nach [143].
3. $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ - Puffer - 0,1M - pH Bereich von 9,7 - 10,9 nach Bates et al. [144], ausgehend von 0,2M NaHCO_3 -Lösung und 0,4M NaOH- Lösung.
4. TRIS/HCl - Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)/HCl 0,1M pH Bereich von 7,1 - 8,9 nach Bates et al. [144], nur 0,2M Ausgangslösungen.
5. $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ - Puffer pH Bereich von 11,0 - 11,9 nach [144] aber 0,2M Na_2HPO_4 und 0,4M NaOH als Ausgangslösungen
6. Natriumphosphatbuffer - 0,1M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) - pH Bereich von 5,8 - 8,0 nach Gomori (oder Sørensen) [145].

7. Kaliumphosphatpuffer - 0,1M (K_2HPO_4/KH_2PO_4) - pH Bereich von 5,0 - 7,92 wie Puffer 6 vorbereitet.
8. MES - Puffer - 0,1M (MES/NaOH) pH Bereich von 6,1 - 7,5
sogenannter "Good's" Puffer [122].
MES = 2-(N-Morpholin)-ethansulfonsäure; MG: 195,2; pK_a = 6,15
9. HEPES - Puffer - 0,1M (HEPES/NaOH) - pH Bereich von 6,8 - 8,2
sogenannter "Good's" Puffer [122].
HEPES = N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure;
MG: 238,3; pK_a = 7,55; Löslichkeit bis 2,25M bei 0°C

Von den oben zitierten Puffersystemen mussten die Puffer 2, 3 und 5 auf Grund der pH-Bereiche, die weit ausserhalb des physiologischen Niveaus lagen, ausgeschlossen werden. Für die anderen Puffer konnte man mittels ständig durchgeführter pH-Kontrollen feststellen, dass in den angegebenen, kleinen Konzentrationen (analog zu Angaben von Cotton [28]) fast keines der Puffersysteme über genügend grosse Pufferkapazität verfügte, um die pH-Werte des Assays auf dem gewünschten Niveau zu halten. Diese Beobachtungen wurden auch durch die Messungen der Enzymaktivität in den Assays bestätigt. Aus diesem Grund entschied man sich, die Konzentration des Puffers in den Proben zu verdoppeln (auf 40mM). Die Ergebnisse werden in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Eine deutliche Ueberlegenheit des Natriumphosphatpuffers konnte verzeichnet werden. Diese steht in Uebereinstimmung mit den Beobachtungen von Tourian [20], der sogar eine stimulierende Wirkung des Phosphatpuffers auf die Enzymaktivität postulierte.

Als zweitbestes Puffersystem konnte der sogenannte MES-Puffer ermittelt werden. Die theoretischen Angaben über diesen Puffer und über die anderen aus der Good's Puffer-Gruppe erlaubten, eine Voraussage in diese Richtung zu machen.

Auch die Ergebnisse der Arbeiten von Weber et al. [12], die wie schon erwähnt (siehe S.24) eine Stabilisierung des Enzyms durch Anwendung des TAPS-Puffers: (TAPS = 3-(Tris(hydroxymethyl)-methyl)-amino-propansulfonsäure) erreicht haben, scheinen unsere Resultate zu bestätigen. Aus Kostengründen und Einfachheit halber hat man sich für den Natriumphosphat-Puffer entschieden. Bei diesen Experimenten konnte man gleichzeitig feststellen, dass nur bei pH 7,6 (Natriumphosphatpuffer) die optimale Ausgangslage für die Phenylalanin-4-Monooxygenase geschaffen wird. Da die Einhaltung des

pH-Wertes möglichst nahe 7,6 die Enzymaktivität eindeutig positiv beeinflusste, hat man die Konzentration des Natriumphosphatpuffers im Assay auf 100 mM erhöht.

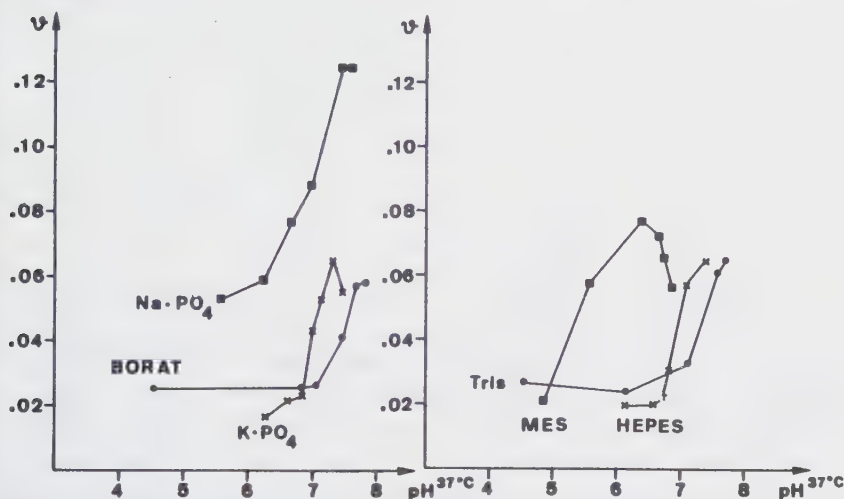


Abb.15 Enzymaktivität (v) als Funktion des Puffersystems und des pH

Im Fall der beiden untersuchten Phosphatpuffersysteme (Natrium und Kalium) ist der Einfluss des Kations auf die Wirksamkeit des Puffers für den Assay auffallend gross.

Der einzige Unterschied zwischen den beiden Puffersystemen ist anscheinend zu Gunsten des Na⁺ für die Phenylalanin-4-Monooxygenase von grosser Bedeutung. Ob das nur den Grössen-, oder auch den Elektropositivitäts- Unterschieden zuzuschreiben ist, bleibt dahingestellt. Diese Beobachtung scheint jedoch nicht nur für die Phenylalanin-4-Monooxygenase zu gelten, da Mann [146] die Aktivierung der Tyrosin-3-Monooxygenase (EC 1.14.16.2) durch Na⁺ feststellte.

Mit dem ausgewählten Puffer und pH-Wert konnte man die kinetischen Kurven nach Michaelis-Menton und Lineweaver-Burk erstellen und somit die quantitativen Beziehungen zwischen den anderen Assaykomponenten und der Enzymaktivität erfassen.

Die Enzymkonzentration wurde in der folgenden Versuchsreihe festgelegt. Verschiedene Volumina der Enzymlösung (siehe S.37) wurden für den "Enzym-Assay" verwendet. Der optimale Arbeitsbereich für das Enzym wurde aus der graphischen Darstellung ermittelt (Abb.16).

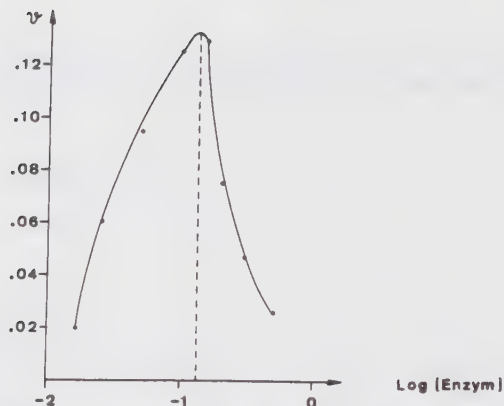


Abb.16 Enzymaktivität als Funktion der Enzymkonzentration im Assay

Konzentration des L-Phenylalanin: Die Ausgangslösung von L-Phenylalanin ist 47,7mM. Nach 10-facher Verdünnung beträgt $E_{257,5} = 0,9301$; ($\epsilon_{257,5} = 195 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Da in diesen Experimenten das 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (6,7-Me₂THPt) als Cofaktor eingesetzt wurde, musste man die Hemmung der Enzymaktivität durch das Substrat nicht befürchten [24]. Dies hat sich auch empirisch bestätigt, da die fast 4mM Lösung von L-Phenylalanin keinerlei hemmende Wirkung ausübte. Abbildung 17 zeigt die graphische Darstellung der Resultate (aus Tabelle V), aus welcher die Michaelis-Konstante K_m extrapoliert wurde.

Tabelle V: Enzymaktivität als Funktion der L-Phenylalanin-Konzentration

Probe	Konzentration L-Phe			Enzymaktivität		
Nr.	47,7mM [μ l]	Konzentration [mM] S	$\frac{1}{S}$	E_{450}	$\frac{v}{[\mu\text{mol Tyr/Assay}]}$	$\frac{1}{v}$
1	10	0,477	2,096	0,279	0,088	11,36
2	20	0,954	1,048	0,327	0,103	9,71
3	25	1,192	0,839	0,338	0,106	9,39
4	30	1,431	0,699	0,348	0,109	9,13
5	35	1,669	0,599	0,299	0,112	8,93
6	40	1,908	0,524	0,262	0,113	8,81
7	80	3,816	0,262	0,131	0,125	8,00

$$K_m = 0,25\text{mM} = 2,5 \times 10^{-4}\text{M}$$

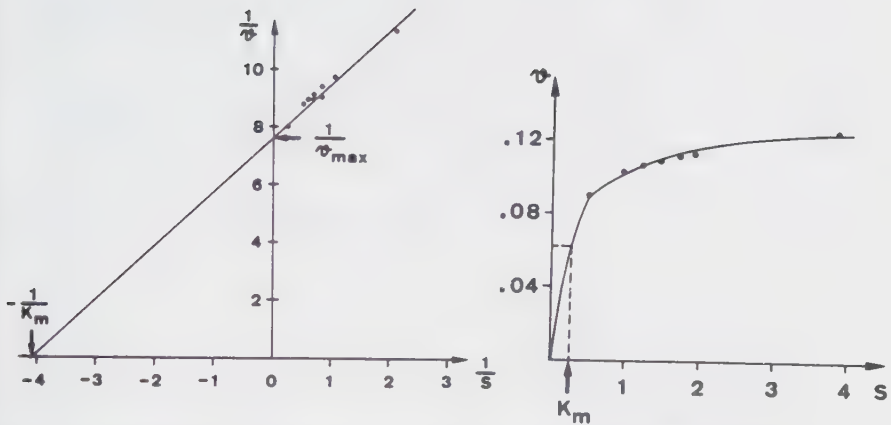


Abb.17 Graphische Ermittlung der kinetischen Daten von L-Phenylalanin

Auch für die anderen Komponenten des "Enzym assays" wurde der K_m -Wert aus den graphischen Darstellungen (nach Michaelis-Menton und nach Lineweaver-Burk) extrapoliert: für Dithiothreitol beträgt sie $6,06 \times 10^{-4}M$ und für 6,7-Dimethyl-6,7,8,9-tetrahydropterin $6,8 \times 10^{-5}M$. Die optimalen Konzentrationen der einzelnen Komponenten des "Enzym assays", die den zehnfachen Werten der jeweiligen Michaelis-Konstanten entsprechen, sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle VI: Optimale Konzentration der Assay-Komponenten

Komponente	K_m [mM]	Optimale Konzentration [mM]
L-Phe	0,25	2,5
DTT	0,61	6,1
6,7-Me ₂ THPt	0,068	0,68

Um die hemmende Wirkung des L-Phenylalanins auf die Phenylalanin-4-Monooxygenase in Gegenwart des natürlichen Cofaktors (5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin) [25] auszuschliessen, wurde seine Konzentration im Assay auf 1,0mM gesenkt. Damit wird die entsprechende Enzymaktivität nur um 10% erniedrigt. Bei der gewählten Temperatur von 37°C, die den Körpervorgängen am nächsten

kommt, hat dieser Assay einen linearen Verlauf bis über 30 Minuten gezeigt. Der positive Einfluss der Katalase auf die Enzymaktivität wurde empirisch geprüft und bestätigt (die Aktivitätserhöhung betrug ca. 30%). Deswegen hat man dem Assay 290 Einheiten dieses Enzyms zugesetzt. Technisch konnte der Assay verbessert werden, indem man die Katalase und das DTT kurz vor Gebrauch direkt im Puffer auflöste. Die Lösung des Cofaktors wurde portionenweise eingefroren und bei -20°C aufbewahrt. Jede Portion wurde nur einmal, und zwar kurz vor Gebrauch, aufgetaut.

Der optimale Assay für die Phenylalanin-4-Monooxygenase wurde wie folgt durchgeführt:

0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,6
1,0mM L-Phenylalanin
100 μl Enzymlösung
3 Minuten bei 37°C aktiviert
290 E Katalase
6mM Dithiothreitol
0,7mM 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin
30 Minuten bei 37°C inkubiert

2.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung ist eine für den Ausdruck der spezifischen Enzymaktivität unentbehrliche Analyse. Hierfür können verschiedene Methoden angewendet werden.

Micro-Biuret Methode. Man hat sich für die Micro-Biuret-Methode nach Itzhaki et al. [147] entschieden, da sie empfindlich und proteincharakterunabhängig sein soll. Es ist eine Modifizierung der Methode von Zamenhoff et al. [148] und basiert auf der Messung der UV-Absorption des Kupfer-Protein-Komplexes, der in einer stark alkalischen Kupfersulfatlösung gebildet wird. Die Entwicklung der Farbe erfolgt innerhalb von 5 Minuten und ist temperaturunabhängig.

Reagenzien: Lösung A = 0,21%-ige (G/V) CuSO_4 -Lösung in 30%-iger (G/V) NaOH
Lösung B = 30%-ige (G/V) NaOH Lösung

Es wird pro 2 ml Probevolumen 1 ml des Reagenzes A oder B einpipettiert, 5 Minuten lang kräftig geschüttelt und dann gegen Wasser (anstatt 2 ml Probe) bei $\lambda = 310 \text{ nm}$ gemessen. Der Unterschied in den Extinktionswerten der A-Reihe und entsprechenden Proben der B-Reihe von der Eichkurve abgelesen ergibt den gesuchten Proteingehalt. Die Eichkurve ist für Albumin im Bereich von 2,6 - 53% (G/V) linear. Die Abbildung 18 zeigt eine für mensch-

liches Albumin typische Eichkurve.

$$(E_{280\text{nm}}^{1\%} = 5,8\text{cm}^{-1\%^{-1}})$$

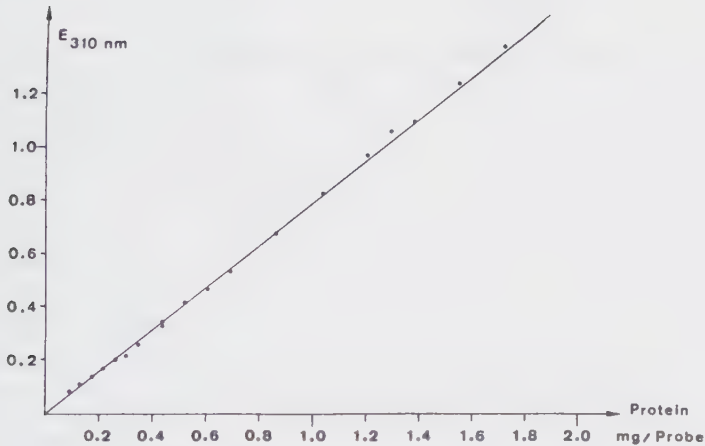


Abb.18 Eichkurve für die Microbiuret-Proteinbestimmung

UV-Absorptionsmessung

Bei der schnellen (eher qualitativen) Ueberprüfung mehrerer Proben nach Eiweiss- Anwesenheit, wie es bei der Fraktionierung der Enzymlösung vorkommt, hat sich die Warburg und Christian-Methode [149] als einfach und schnell erwiesen. Anhand eines Nomographs ermittelt man hier sowohl die Protein-, als auch die Nukleinsäuren-Konzentration, indem man die Proben gleichzeitig bei $\lambda = 260\text{ nm}$ und $\lambda = 280\text{ nm}$ misst. Sie kann natürlich nicht als exakte Methode betrachtet werden, da alle in diesem Bereich des UV-Lichtes absorbierenden Substanzen die Messwerte beeinflussen könne.

Lowry-Methode [150] Diese Methode wurde bei glycerinhaltigen Lösungen angewendet. Der Nachteil dieser Bestimmung ist, dass sie vom Proteincharakter abhängig ist und durch die Anwesenheit von Phenol-Derivaten (wie z.B. Thy-mol oder Sulfosalicylsäure) trotz Abwesenheit von Proteinen positiv ausfallen kann. Interferierend wirken hier auch K^+ und Mg^{2+} -Kationen, sowie EDTA, Tris, Harnsäure, Guanin, Xanthin, Thiole, Kohlehydrate und Hydrazin [147].

Reagenzien: Lösung A: 2%-ige (G/V) Na_2CO_3 in 0,1N NaOH

Lösung B: 0,5%-ige (G/V) CuSO_4 in Wasser

Lösung C: 1%-ige (G/V) Na-K-Tartrat in H_2O

Lösung D: 48 ml Lsg. A

1 ml Lsg. B

1 ml Lsg. C

Folin-Lösung: Folin-Reagens (Merck) mit H_2O 1:1 verdünnt

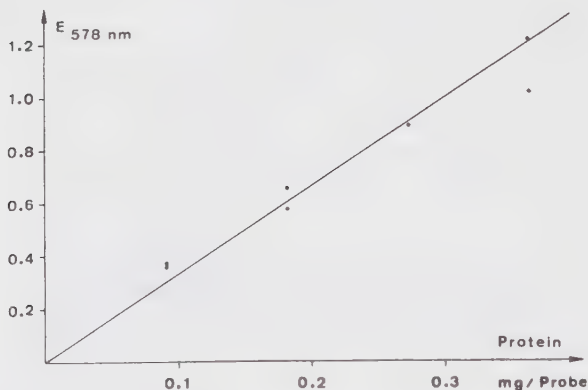


Abb.19 Eichkurve für die Lowry-Proteinbestimmung

Proteinprobe mit 0,2N NaOH auf 1 ml Gesamtvolumen auffüllen. 0,5 ml davon mit 5 ml Lösung D vermischen und 15 Minuten stehen lassen. 0,5 ml Folin-Lösung hinzugeben, rühren, wieder 30 Minuten stehen lassen und bei $\lambda = 650$ nm ablesen. Bei einem Proteingehalt zwischen $5\text{--}25\mu\text{g}$ Protein/Probe ist die Wellenlänge $\lambda = 750$ nm, bei mehr als $100\mu\text{g}$ /Probe die Wellenlänge $\lambda = 578$ nm zu empfehlen. Die Abbildung 21 zeigt eine typische Lowry-Eichkurve für menschliches Albumin ($E_{280\text{nm}}^{1\%} = 5,8\text{cm}^{-1}\%$).

2.2.3 Nachweismethoden für das entstehende L-Tyrosin

Das Entstehen des L-Tyrosins kann als direktes Resultat der Enzymwirkung betrachtet werden. Deswegen hat man aus der ganzen Auswahl der Methoden die zur Messung der Enzymaktivität (vergl. Tab.I) angewendet wurden a priori diejenigen ausgeschlossen, die sich mit den anderen Produkten der katalytischen Reaktion der Phenylalanin-4-Monooxygenase beschäftigen. Hierzu gehörten z.B. die Phenylalanin-abhängige NADPH-Oxidierung ($\lambda = 340$ nm), die

Phenylalanin-abhängige Tetrahydropterin Oxidierung ($\lambda = 330\text{--}340\text{ nm}$ in Abwesenheit des NADPH und Dihydropteridin-Reduktase) oder der Phenylalanin-abhängige Sauerstoffverbrauch.

2.2.3.1 Bestimmung mit der 1-Nitroso-2-Naphthol-Methode

Die von den meisten Forschern verwendete 1-Nitroso-2-naphthol Reaktion wurde von Gerngross et al. [151] für die ortho- und para- substituierten Phenole entdeckt. Das Tyrosin/1-Nitroso-2-naphthol-Chromophor ist ein Kondensationsprodukt der äquimolaren Mengen beider Partner [138]. Der gemessene Tyrosin-Gehalt entspricht nur zu ca. 57% der tatsächlichen Menge, denn ca. 27% des Tyrosins unterliegen bei den Reaktionsbedingungen einer Nitrierung und ca. 16% des schon entstandenen Kondensats werden während der Extraktion (mit CHCl_3 oder CH_2Cl_2) entfernt. Die Methode erfasst alle o- und p-substituierten Phenole (z.B. Tyrosin und Tyramin). Als Nachweisgrenze haben wir für die spektrophotometrische Messung eine Konzentration zwischen 0,003 - 0,42M ermittelt. Die normal gebräuchlichen Reduktionsmittel, wie Ascorbat, Mercaptane etc. beeinflussen diese Bestimmung ungünstig. Dithiothreitol (DTT) dagegen verhält sich neutral [9]. Der genaue Verlauf dieser Methode wurde bereits auf Seite 38 geschildert. Abb.20 zeigt eine typische Eichkurve.

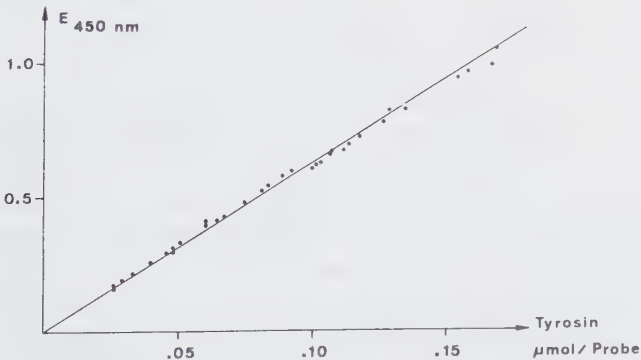


Abb.20 Eichkurve für die 1-Nitroso-2-naphthol Methode

2.2.3.2. Direkte UV-Messung

Shiman et al. [21] haben 1979 eine neue Technik der Enzymreinigung veröffentlicht (siehe Kap. 3). In dieser Arbeit wurde auch gleichzeitig eine neue und einfache Enzym Assay-Auswertung beschrieben. Der ganze Assay wird

direkt in der Küvette durchgeführt und der Verlauf somit von Anfang an spektrophotometrisch kontrolliert ($\lambda = 275 \text{ nm}$ für Tyrosin). Als Gerät wurde ein Gilford Spektrometer (+Integrating Digital Readout Unit) [22] verwendet, das die Werte in Abständen von 10 Sekunden aufzeichnet. Diese Methode wurde nachvollzogen. Alle Assaylösungen (mit Ausnahme der Enzym- und Cofaktor-Lösung) wurden bei 25°C thermostatisiert und dann direkt in die bei 25°C thermostatisierte Halbmikro-Quarzküvette einpipettiert.

0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,6

1,0mM L-Phenylalanin

290 E Katalase

100 μl Enzymlösung

3 Minuten bei 25°C aktiviert

dann

6mM Dithiothreitol

0,7mM 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin

hinzupipettiert und der Recorder eingeschaltet. Als Gerät wurde ein UNICAM SP-1700 mit SP-1805 Programm controller und AR-25 linear recorder benutzt. Als Leerwert wurde die Probe ohne L-Phenylalanin verwendet. Den typischen Verlauf eines solchen Assays zeigt Abbildung 21.

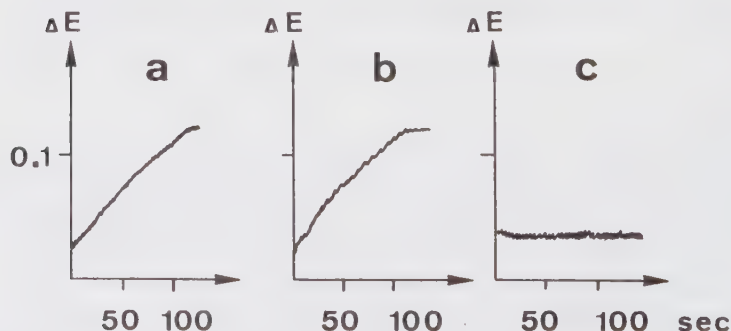


Abb.21 "Direkte" UV Messung des "Enzym assays"

a.) und b.) Enzymproben c.) Leerwert

In unserem Fall gelang jedoch die Messung nur bei den gereinigten Enzympräparaten, d.h. der "crude extract" war nicht messbar. Auch bei den reineren Enzymlösungen mussten alle verwendeten Lösungen der Assay-Komponenten über einen Millipore-Filter zusätzlich gereinigt werden. Nur durch Einhalten dieser Schritte konnte die "direkte" Messung sehr gut durchgeführt werden. Abbildung 22 stellt die Eichkurve für diese Bestimmung dar.

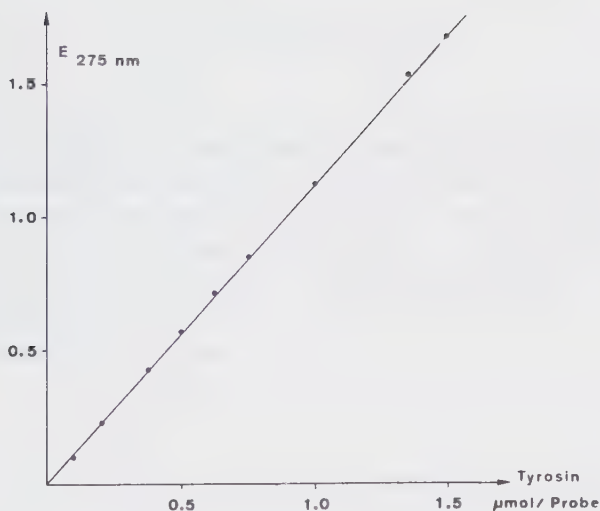


Abb.22 Eichkurve für die "direkte" UV-Bestimmung des L-Tyrosins

2.2.3.3. "Indirekte" UV-Messung

Um die Reinigung des Enzyms von Anfang an verfolgen zu können, war es nötig, eine Modifizierung dieser Methode auszuarbeiten. Das konnte insofern ohne grösseren Arbeitsaufwand realisiert werden, als man nach der normalen Durchführung unseres "Enzym assays", wie auf Seite 44 beschrieben, die deproteinisierten Ueberstände der Proben bei $\lambda = 275 \text{ nm}$ gegen die eigenen Leerwerte mass. Nach der Messung konnten diese Proben noch mit anderen Messmethoden kontrolliert werden. Gleichzeitig hatte man jedoch die Möglichkeit, sich schnell einen Ueberblick zu verschaffen. Bei dieser Methode musste eine 5%-ige (G/V) CCl_3COOH -Lösung als Deproteinisierungsmittel angesetzt werden (um einen Beitrag zur UV-Absorption auszuschliessen). Nach Inkubation bei 37°C wurden die Proben mit 0,2 ml 30%-iger (G/V) Trichlor-essigsäure versetzt und nach 10-minütigem Stehenlassen während 20 Minuten bei $2'000 \times g$ zentrifugiert. Die Ueberstände hat man dann gegen den eigenen Leerwert bei $\lambda = 275 \text{ nm}$ gemessen.

2.2.3.4. Quantitative Bestimmung mit Hilfe der Gaschromatographie

Um sicherzustellen, dass der gemessene Wert tatsächlich ausschliesslich

L-Tyrosin (4-Hydroxy-L-phenylalanin) erfasst, ist man zur gaschromatographischen Bestimmung übergegangen.

2.2.3.4.1 Synthese der GC-Derivate

Trimethylsilyl (TMS)-Derivate. Die Silylierung erfüllt fast alle der auf S.34 erwähnten Bedingungen, ausgenommen die N-TMS-Derivate, die leicht hydrolysierbar sind. Am besten beugt man dieser Hydrolyse mit Auswahl des entsprechenden Säulenmaterials (wie z.B. SE-30, W-98, OV-1 oder QF-1 in kleineren Konzentrationen auf desaktivierten Trägermaterialien) vor.

Man wählte deshalb folgende GC-Bedingungen:

GC-Säule: 2m lang, 2 mm i.D. mit 3% SE-30 auf Gaschrom Q (100/120 mesh)
o. 6% QF-1 auf Chromosorb W AM/DMCS (80/100 mesh)
40 ml N₂/Min

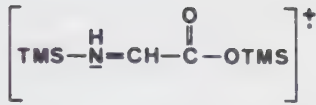
Gerät: Perkin-Elmer F 3920

GC-Programm: Anfangsisotherme: 4 Min 100°C, dann 8°C/Min bis 280°C
Endisotherme: 4 Min 280°C
Einspritzblock: 280°C, Interface: 315°C

Abbildung 23 zeigt das GC-Chromatogramm dieser Derivate.

Die Derivate wurde zuerst nach Gehrke et al. [152,153] hergestellt. Die Proben wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und Wasserspuren azeotrop mit CH₂Cl₂ entfernt. Danach wurden 0,1 ml Acetonitril zugegeben und während 30 Minuten bei 100°C geheizt. Nach Zugabe von 0,1 ml BSTFA hat man die Proben über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschliessend noch 15 Minuten lang bei 135°C geheizt.

Die Silylierung nach Donike [121] wurde dann als schnellere und einfachere Methode vorgezogen. Pro 20 µg Aminosäure verwendete man 0,05 ml Acetonitril, 0,06 ml MSTFA und 0,04 ml TMCS und liess dieses Reaktionsgemisch 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Das 4-Chlor-DL-phenylalanin wurde als interner Standard (IS) gewählt. Die Abbildung 23 zeigt ein typisches Testchromatogramm für die SE-30 Säule. Die erhaltenen Chromatogramme waren befriedigend und die erstellte Eichkurve zeigte eine Linearität im Bereich von 0,5 - 40 µg L-Tyrosin/Probe. Die massenspektrometrische Untersuchung dieser Derivate zeigte jedoch eindeutig zwei entscheidende Nachteile (Abb.24). Erstens: Das Hauptsignal bei m/z 218 ist charakteristisch für alle α-Aminosäuren und entspricht dem folgenden Fragment:



Dieses ist somit nicht spezifisch für L-Phenylalanin oder L-Tyrosin. Alle anderen Signale zeigen eine zu niedrige Intensität um für die eventuelle massenfragmentographische (SIM) Bestimmung nützlich zu sein. Zweitens können die durch die natürlichen Isotopen des Siliciums verursachten Isotopensignale bei der quantitativen Auswertung der MS-SIM-Spektren der deuterierten Verbindungen störend wirken.

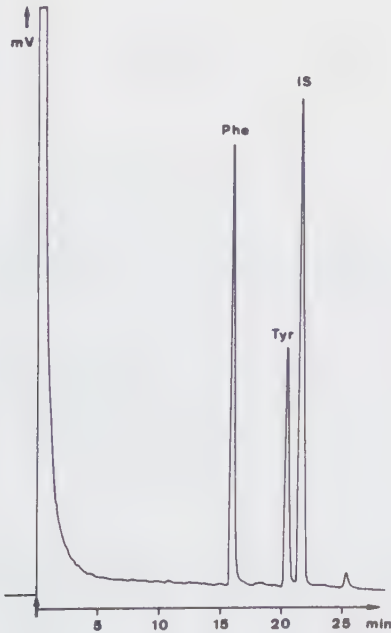


Abb.23 GC-Chromatogramm von L-Phe und L-Tyr als TMS-Derivate
IS - interner Standard, d.h. 4-Chlor-DL-phenylalanin

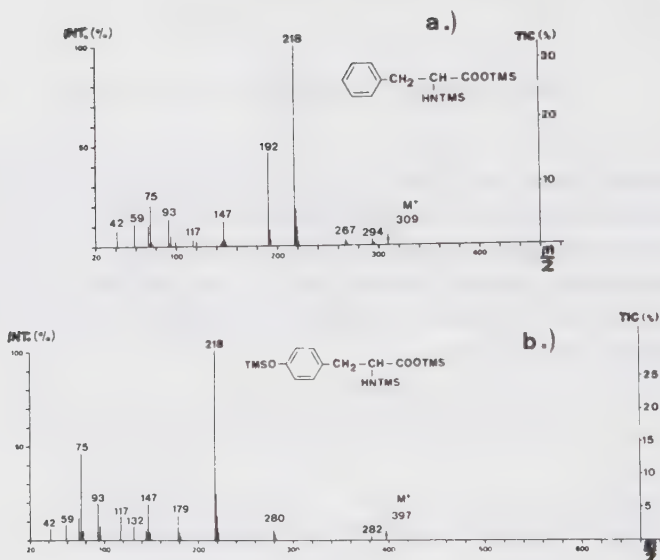


Abb.24 EI-Massenspektren von a) L-Phe (N-TMS, TMS-Ester)
b) L-Tyr (N,O-BisTMS, TMS-Ester)

N-Trifluoracetyl (TFA),O-TMS,TMS-ester Derivate. Diese von Donike [155] beschriebene Derivatisierung, die auch durch Schwarz et al. [156] angewendet wurde und die eine N-Trifluoracetylierung mit gleichzeitiger O-Trimethylsilylierung ergeben sollte, zeigte als Nebenreaktion eindeutig eine N,O-Trifluoracetyl,N-trimethylsilyl,O-trimethylsilylierung. Die folgende Modifizierung [154], die diesen Seitenweg ausschliessen sollte, ergab bei uns keine deutliche Besserung dieser Derivatisierung.

Heptafluorbutyryl(HFB)-i-butyl-ester. Diese Veresterung wurde nach dem Fischer-Prinzip durchgeführt [157,158,159]. Die Probe wurde eingedampft und getrocknet. Pro 50 - 250 nmol Aminosäure wurden 0,2 ml 3N HCl Lösung in i-BuOH zugegeben und das Reaktionsgemisch während 20 Minuten bei 110°C geheizt. Nach dem Abkühlen hat man die Proben acyliert. Zur Trockene eingedampft, wurden sie mit 0,05 ml Ethylacetat und 0,02 ml Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) versetzt und während 15 Minuten bei 150°C geheizt. Die Einspritzung kann nach dem anschliessenden Eindampfen und der Aufnahme in 0,1 ml Ethylacetat und 0,05 ml Essigsäureanhydrid (Ac₂O) erfolgen.

GC-Bedingungen:

GC-Säule: 2,5 m lang, 2 mm i.D., mit 3% SE-30 auf Gaschrom Q(100/120 mesh)

GC-Programm: Anfangsisotherme: 4 Min 120°C, dann 4°C/Min bis 250°C

↑ mV
Endisotherme: 4 Min 250°C
Einspritzblock: 260°C
Trärgas: 40 ml N₂/Min
Interface: 280°C

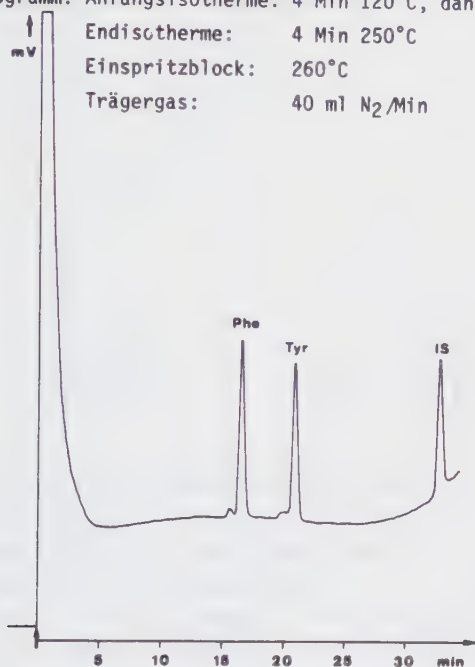


Abb.25 GC-Chromatogramm von L-Phe und L-Tyr (HFB, i-Bu-Ester)

IS - interner Standard, d.h. 4-Chlor-DL-phenylalanin

Das Chromatogramm (Abb.25) zeigt eine sehr gute Trennung der Aminosäuren. Bei dieser Arbeitstemperatur war die Lebensdauer der Säule jedoch zu kurz. Um für die MS- Analysen eine möglichst kurze Säule zu haben, (die Substanzen werden bei niedrigerer Temperatur eluiert), versuchte man noch eine andere Phase:

1 m lange Säule (2 mm i.D.) mit 2% Dexsil auf Chromosorb W.

Bei dieser Säule reichte das folgende GC-Programm um eine befriedigende Trennleistung zu erhalten.

Trärgas: 40 ml N₂/Min

Anfangsisotherme: 4 Min bei 80°C, dann 3°C/Min bis 230°C

Endisotherme: 4 Min bei 230°C

Einspritzblock: 240°C

Interface: 260°C

Die MS-Spektren (Abb.26) für diese Derivate zeigen folgende Hauptsignale: m/z 148 für L-Phenylalanin (N-HFB,i-Bu-ester), und m/z 360 für L-Tyrosin (N,O-BisHFB,i-Bu-ester).

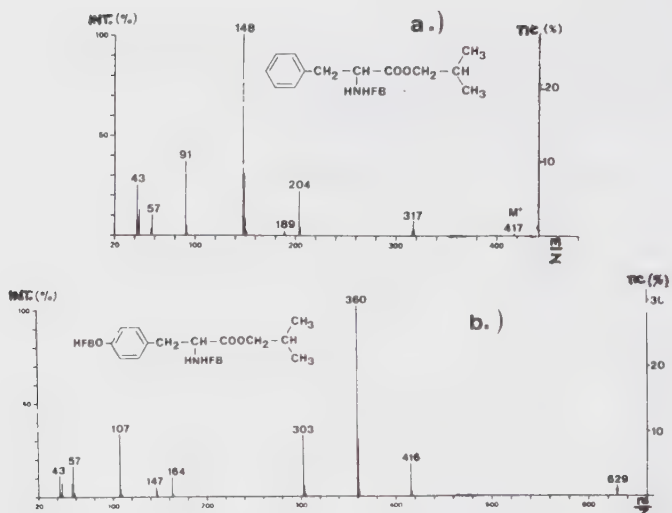


Abb.26 EI-MS-Spektren von L-Phe (a) und L-Tyr (b) als HFB, i-Bu-Ester.

Die deuterierten Verbindungen konnte man jedoch dieser Derivatisierungsprozedur nicht aussetzen, da man mit einem Deuteriumaustausch rechnen musste, was sich auch experimentell bestätigt hat. Ungünstig für die SIM-Messung ist auch das weite Auseinanderliegen der beiden Hauptsignale, das einen Verlust an Empfindlichkeit zur Folge hat. Aus diesem Grund versuchte man, das Anhydrid einer kürzeren Carboxylsäure zu verwenden. Das Problem mit dem Deuteriumaustausch blieb jedoch weiterhin, so dass man auf eine andere Derivatisierung ausweichen musste.

N,O-Trifluoracetyl (TFA)-methylester Derivate

Die getrockneten Proben wurden mit 0,2 ml Acetonitril und 0,2 ml Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) versetzt, und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde mit Stickstoff zur Trockene abgeblasen und mit Diazomethan-Lösung in Diethylether verestert. Nach vollständiger Methylierung wieder eingedampft und in 0,2 ml Acetonitril mit 0,04 ml TFAA aufgenommen, waren die Proben zum Einspritzen bereit.

GC-Bedingungen: GC-Säule: 4 m lang, 2 mm i.D., mit 2,5% SE-30 auf Chromosorb G(HP) 80/100 mesh Gerät: Perkin Elmer F-990

GC-Programm: Trägergas: 40 ml N₂/Min

Anfangsisotherme: 4 Min 120°C, dann 4°C/Min bis 200°C

Endisotherme: 4 Min 200°C

Einspritzblock: 255°C Manifold: 260°C

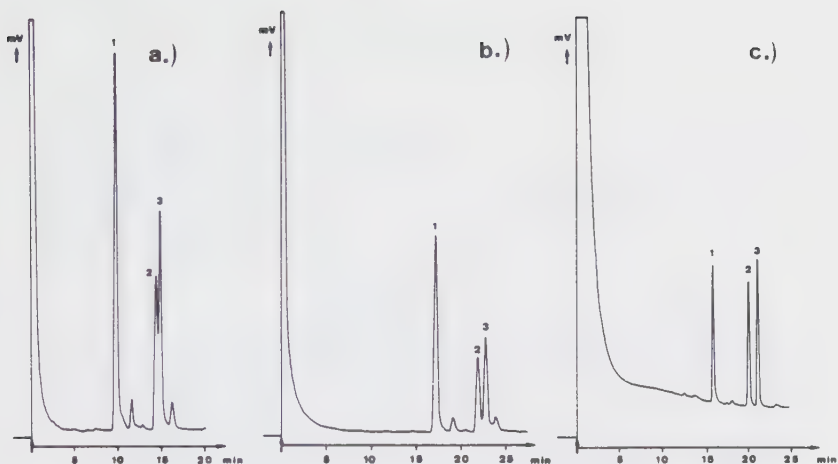


Abb.27 Abhängigkeit der GC-Trennleistung von der Säulenlänge und ihrer Belegung für TFA, Me-Ester Derivate: 1 = L-Phe, 2 = L-Tyr, 3 = IS
 a.) 1 m Säule 2,5% SE-30 b.) 2,5 m Säule 3% SE-30
 c.) 4 m Säule 2,5% SE-30

Die MS-Spektren (Abb.28) zeigen sehr günstige Voraussetzungen für die Massenfragmentographie.

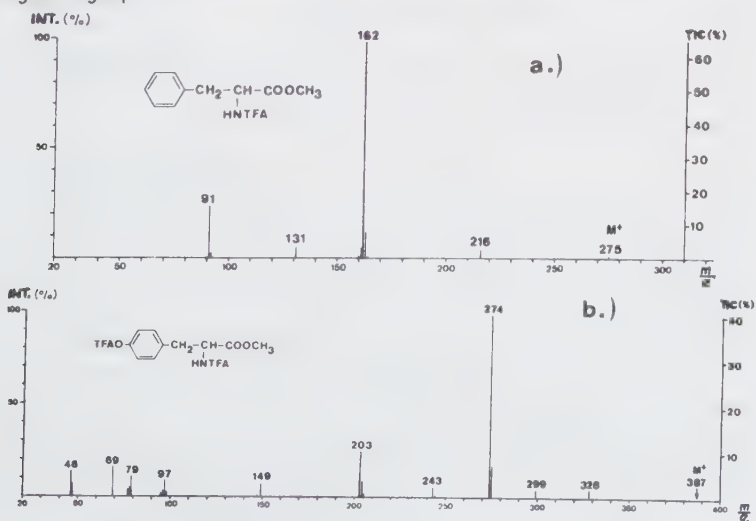
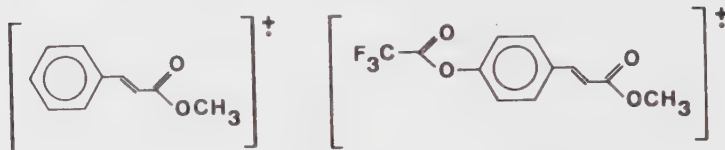


Abb.28 EI-MS-Spektren N,(O)-TFA, Me-ester von L-Phe (a) und L-(Tyr) (b)

Man sieht ein sehr intensives Signal bei m/z 162 für Phenylalanin resp. 274 für Tyrosin, was folgenden Fragmenten entspricht:



Die GC-MS/SIM-Bedingungen wählte man wie folgt:

Gerät: Carlo Erba GI 450 Gaschromatograph, Fractovap 2101 AC

GC-Säule: 80 cm lang, 2 mm i.D. mit 2,5% SE-30 auf Chromosorb Q
(80-100 mesh)

GC-Bedingungen: Trägergas: Helium mit 1,0 atm Vordruck

Einspritzblock: 250°C

Temperatur: 150°C isotherm für Phenylalanin

165°C isotherm für Tyrosin

Vacuum Generators Massenspektrometer, Micromass 16F mit Data System 2000

Separator: single jet 260°C

Ionenquelle: 220°C

20 eV, Emission: 50 µA; SEV: 2,5 kV

2.2.3.4.2 Gaschromatographisches Verfahren

Die gaschromatographische Bestimmung nach der oben beschriebenen Methode ergab eine im Bereich von 0,025 - 2,0 µmol/Probe lineare Eichkurve für L-Phenylalanin und L-Tyrosin (siehe Abb.29)

Der Nachweisbereich liegt zwischen 0,01 - 4 µmol/Probe, d.h. bei einer Konzentration zwischen 0,01 - 4mM (oder 0,07 - 0,27 nmol/Injektion) bei gleichbleibender elektronischer Verstärkung. Das bedeutet, dass durch die elektronische Verstärkung der Nachweisbereich nochmals um mindestens den Faktor 10 vergrößert werden kann.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch eine zehnfache Inkubation der gleichen Probe ermittelt. Um auch für sehr niedrige Werte eine Aussage machen zu können, wurde mit einem wenig aktiven "crude extract" inkubiert. Die Resultate sind in Tabelle VII zusammengestellt.

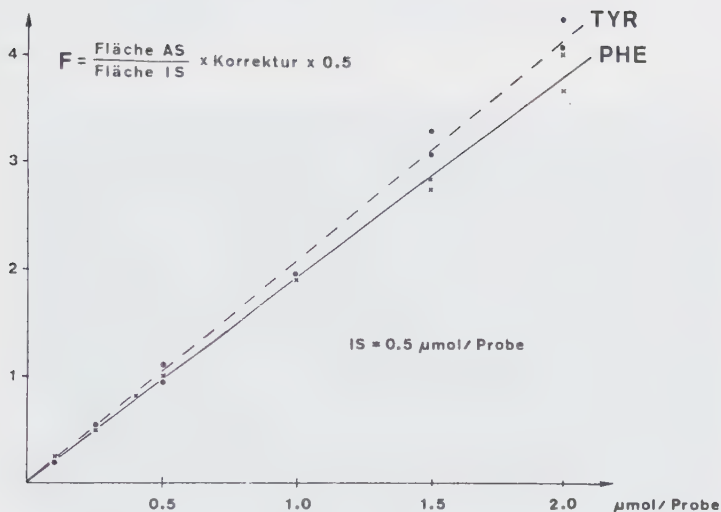


Abb.29 Eichkurven für die GC-Bestimmung von L-Phe und L-Tyr

Tabelle VII: Reproduzierbarkeit der Methode mit GC-Nachweis

Amino- säure	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{X} \pm S$	σ_x	Variationskoeffizient VK (%)
L-Phe	$3,68 \pm 0,31$	0,295	8,42
L-Tyr	$0,14 \pm 0,005$	0,0045	3,45
<u>1-Nitroso-2-Naphthol Methode</u>			
L-Tyr	$0,07 \pm 0,001$	0,001	1,43

Zum Vergleich wurden die Proben gleichzeitig noch mit der 1-Nitroso-2-naphthol Methode ausgewertet, was ca. 50% niedrigere Werte ergab (vergl. S.47). Die scheinbar günstigeren Variationskoeffizient-Werte für Farbreaktion sind dadurch erklärbar, dass die Ueberstände aus der Inkubation noch durch eine zusätzliche Reinigung für die GC-Bestimmung vorbereitet werden mussten, um die Derivatisierung befriedigend ausführen zu können. Es handelte sich dabei um eine Ionenaustauschromatographie. 0,5 ml der Probe wurde nach Inku-

bation mit 0,5 μmol internem Standard (4-Cl-DL-Phe) versetzt und auf eine Dowex 50 W X 8 ($V = 1,5 \text{ ml}$) Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit Wasser, eluierte man die Probe mit 1N NH_4OH und sammelte jeweils 1 ml Fraktionen. Die Semiautomatisierung dieser Stufe versuchte man auf folgende Weise zu erreichen:

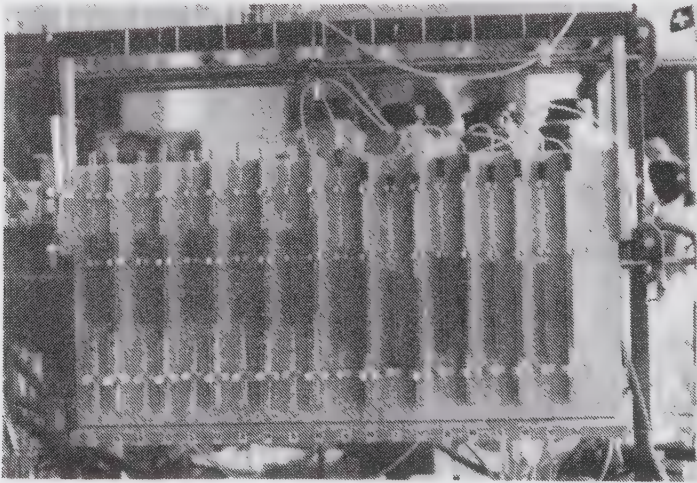


Abb.30 Ionenaustauschchromatographie für die GC-Bestimmung von L-Phe und L-Tyr

Alle gesammelten Fraktionen wurden spektrophotometrisch auf die Anwesenheit von L-Phe und L-Tyr bei $\lambda = 240 \text{ nm}$ gegen Wasser kontrolliert. Die UV-absorbierenden Fraktionen wurden vereinigt, mit dem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und dann direkt derivatisiert (siehe S.54). Da die SE-30 Belegung der GC-Säulen von Charge zu Charge verschiedene Lebensdauer zeigte, hat man ein anderes Material gewählt und arbeitete fortan mit 6% QF-1 auf Chromosorb W (AM- DMCS) bei folgenden Bedingungen:

2 m lange Säule mit 2 mm i.D.

Trärgas: 1,3 atm N_2 bzw. 1,4 atm He

GC-Programm: Anfangsisotherme: 2 Min bei 120°C , dann $5^\circ\text{C}/\text{Min}$ bis 190°C

Endisotherme: 8 Min bei 190°C

Einspritzblock: 215°C

Manifold: 260°C

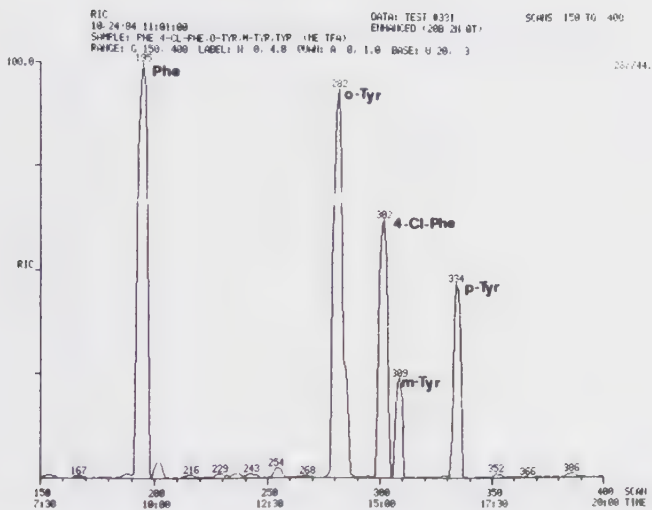


Abb.31 GC-MS-RIC Chromatogramm des Testgemischs (Me-TFA Derivate)

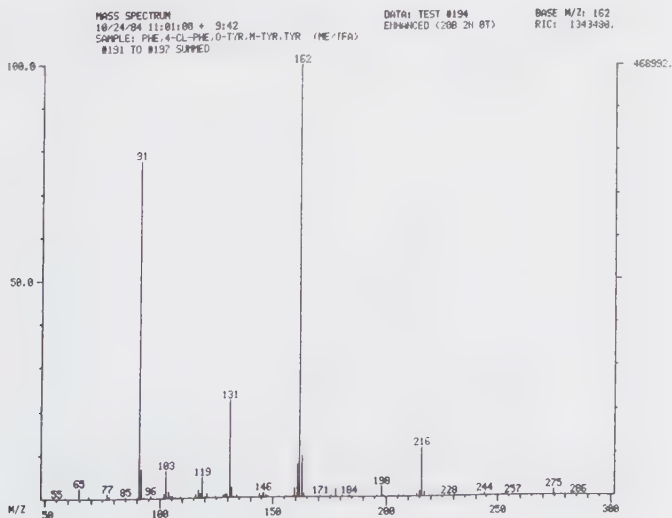


Abb.32a EI-Massenspektrum von L-Phe (Me-TFA)

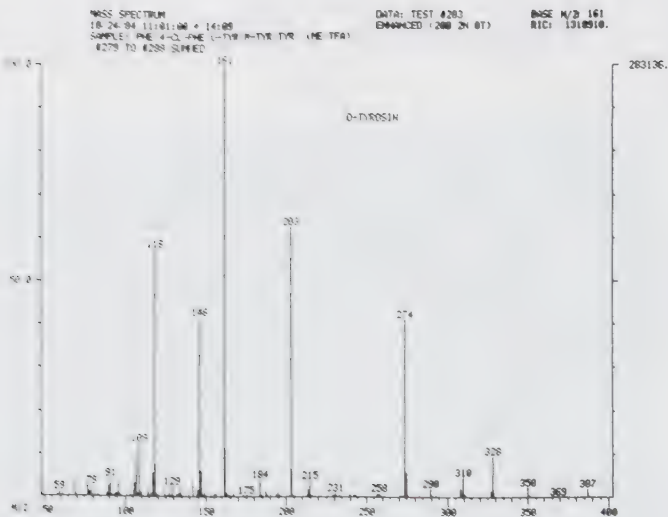


Abb.32b EI-Massenspektrum von o-L-Tyr (Me-TFA)

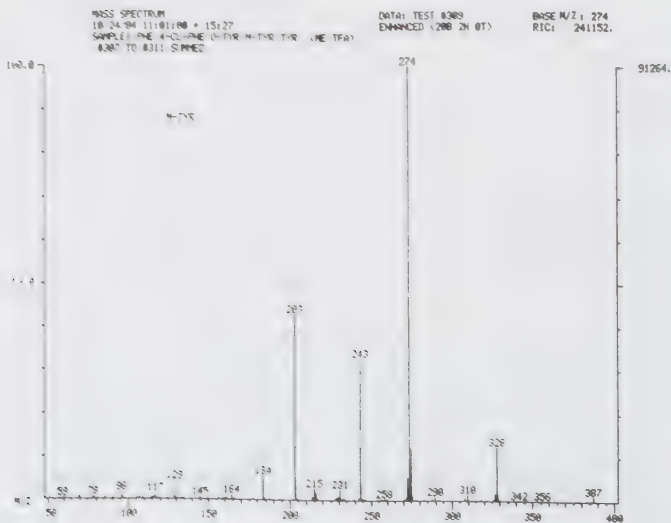


Abb.32c EI-Massenspektrum von m-L-Tyr (Me-TFA)

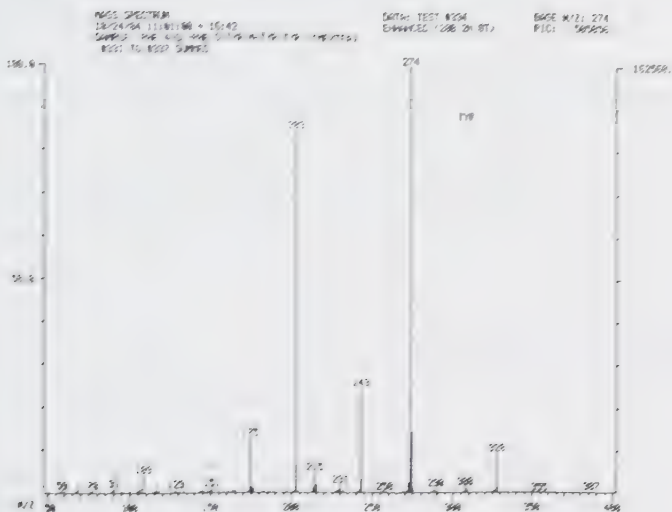


Abb.32d EI-Massenspektrum von p-L-Tyr (Me-TFA)

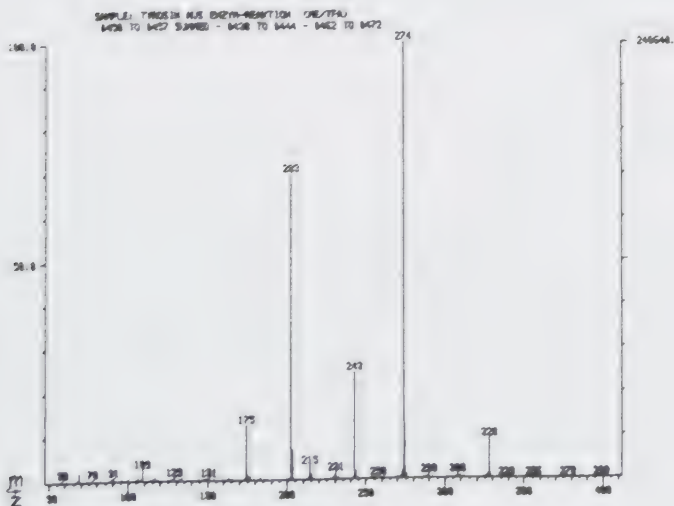


Abb.33 EI-Massenspektrum des Produkts aus der enzymatischen Reaktion (Me-TFA)

Produktkontrolle. Bei diesen Bedingungen konnte man auch die ortho- und meta-Isomere des L-Tyrosins von L-Tyrosin (d.h. vom para-Isomer) trennen, wodurch man über eine Kontrolle für die enzymatische Reaktion der Phenylalanin-4-Monooxygenase verfügte. Die Abbildungen 31 und 32a-d zeigen ein Gaschromatogramm und die EI-Massenspektren eines Tests. Auf Grund dieser Produktkontrolle konnte man eine fundierte Aussage über die Stereospezifität der Phenylalanin-4-Monooxygenase machen. Es hat sich eindeutig gezeigt, dass aus dem L-Phenylalanin ausschliesslich das 4-Hydroxy-L-phenylalanin, also das L-Tyrosin entsteht (Abb.33). Im Nachweisbereich unserer Methode konnte man keines der anderen Isomere finden.

Wiederfindung des L-Phe und L-Tyr. Um die ausgearbeitete Methode gründlich zu testen, hat man noch die Wiederfindung des L-Phenylalanins und des L-Tyrosins geprüft. Zum Leerwert des "Enzym assay" wurden ganz bestimmte Mengen dieser beiden Aminosäuren zugemischt und die ganze Prozedur durchgeführt. In den zwölf angesetzten Proben variierten die Mengen zwischen 0,05-4 μmol . Die durchschnittlichen Verluste betrugen 6,28% für L-Phe und 9,62% für L-Tyr.

2.2.3.5 Quantitative Bestimmung mittels der GC-MS/SIM Technik

2.2.3.5.1 Synthese von deuteriertem Phenylalanin und Tyrosin

3,5- $[\text{}^2\text{H}]_2$ -L-Tyrosin Synthese

a) Synthese des 3,5-Dibrom-L-Tyrosins [160,161]

Zu einer Suspension von 3 g L-Tyrosin (0,017 mol) in 10 ml Eisessig wurde unter ständigem Rühren eine Lösung von 5,4 g Brom (0,034 mol ; 1,73 ml) in 20 ml Eisessig (AcOH) tropfenweise hinzugegeben. Die Temperatur wurde bei 20°C gehalten. Nach vollständiger Zugabe hat man das Reaktionsgemisch noch 30 Minuten lang gerührt und dann über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Eine gelbliche, feste Masse sonderte sich von der orangefarbenen Flüssigkeit ab. Nach Abnutschen und Waschen mit kleinen Portionen AcOH wird die Probe in Wasser mit ein Paar Tropfen 0,1N HCl aufgelöst und mit 4N NaOH auf pH 8,0 gebracht. Die ungelösten Partikel wurden abfiltriert und das Filtrat mit AcOH auf pH 4,7 gebracht. Den ausfallenden Niederschlag ($pI_D = 4,30$) abnutschen und mit Eiswasser nachwaschen. Im Vacuum im Exsiccator über KOH über Nacht stehen lassen und dann noch am Hochvacuum nachtrocknen (0,01 Torr, 40°C, 10 Std.).

Produkt: 5,7 g (0,0168 mol), 98% Ausbeute, Smp. 242°C (Zers.)

DC: $R_f = 0,48$ (0,1 mm Cellulose F);

Mobile Phase: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/17\% \text{ NH}_3$ 2 : 2 : 1

Laufzeit: 140 Min

$r_f = 1,35$ nur 1 Peak vorhanden (Bedingungen siehe Seite 54)

b) Synthese des 3,5- $[\text{H}]_2$ -L-Tyrosin

Mit Hilfe der katalytischen dehalogenierenden Deuterolyse aus 3,5-Br₂-L-Tyrosin hergestellt.

Trägerkatalysator: 10% Palladium auf Aktivkohle (Fluka, puriss.), Modellreaktion mit einer H₂-Burette durchgeführt, um die Stöchiometrie der Reduktion zu kontrollieren. 0,5 g (1,475 mmol) 3,5-Br₂-L-Tyrosin in 15 ml AcOH aufgelöst, 50 mg Katalysator hinzugefügt. Bei $p_1 = 725$ mm Hg Aussendruck wurden in ca. 1 Stunde 69,5 ml H₂ ($=V_1$) verbraucht,

$$V_2 = \frac{p_1 V_1}{p_2} = \frac{725 \text{ mm Hg} \times 69,5 \text{ ml}}{760 \text{ mm Hg}} = 66,3 \text{ ml H}_2 (2,95 \text{ mmol})$$

d.h. um beide Brom-Atome auszutauschen wurden 2,95 mmol H₂ benötigt.

Somit wäre diese Deuterolyse stöchiometrisch erfasst. Das Produkt wurde zuerst mit Filterpapier (um den Katalysator zurückzugewinnen) über eine Fritte abfiltriert, nochmals durch eine G-4 Nutsche filtriert und dann über eine Cellit-Säule (ca. 3 ml) gereinigt. Das Effluent wurde auf pH ca. 6,0 gebracht ($pI^D = 5,66$), der Niederschlag abfiltriert, getrocknet und in warmem Wasser umkristallisiert.

Dasselbe wurde mit Deuterium wiederholt (puriss, 99,8%, Fluka), AcOD (MSD, 98%), D₂O (MSD, 99,7%)

Produkt: 0,194 g, 72% Ausbeute, Smp. 342°C (Zers.)

DC: (Bedingungen wie vorher) : $R_f = 0,57$ (L-Tyr)

GC: $r_f = 1,15$ (nur ein Peak vorhanden; Bedingungen siehe Seite 54)

MS: $d_2 = 90,2\%$ $d_1 = 8,2\%$ $d_0 = 1,6\%$

Gesamt Ausbeute: 71%

4- $[\text{H}]_2$ -L-Phenylalanin Synthese

a) Synthese des 4- $[\text{H}]_2$ -DL-Phenylalanin

Die Bedingungen wie vorher, Modellreaktion wieder mit H₂ in der Burette ausgeführt.

199,6 mg (1 mmol) 4-Cl-DL-Phe (Serva, reinst)

20,0 mg 10% Pd auf Aktivkohle

10 ml AcOH (Merck, p.a.)

5 ml Wasser dest.

Aussendruck: 718 mm Hg. Nach 12 Minuten - 27,1 ml H₂ verbraucht.

Umrechnung auf die normalen Bedingungen:

$$V_2 = \frac{27,1 \times 718}{760} = 25,61 \text{ ml H}_2$$

Ca. 1 mmol wurde verbraucht, 1 Atom Cl hat reagieren können. Der stöchiometrische Verlauf der Reaktion wurde bestätigt.

Das Gleiche für die Deuterolyse:

0,5 g (2,51 mmol) 4-Cl-DL-Phenylalanin

1,25 ml D₂O (MSD, 98%)

12,5 ml AcOD (MSD, 99,7%)

Das 4-Cl-Phe durch Heizen (bis 60°C) auflösen, dann auf 20°C abkühlen.

0,2 g 10% PD-C (Fluka, puriss.) und 5 ml D₂O zugeben und unter N₂ rühren. Dann nach Zugabe von D₂-Gas noch ca. 1 Stunde bei 20°C rühren. Weiter wie vorher das Tyrosin aufarbeiten, auf pH 6,0 bringen (pI^d = 5,48).

Produkt: 0,37 g, 88,9% Ausbeute, Smp. 270°C (Zers.)

DC: R_f = 0,44 (Bedingungen: 0,25 mm SiO₂-Platte;

mobile Phase: n-PrOH/33% NH₃ 7 : 3; Laufzeit: ca. 3.5 Stunden

GC: r_f = 0,54 (N-TFA, Me-ester; kein anderer Peak vorhanden)

Bedingungen siehe Text.

MS: % Deuterium: d₁ = 96,0% d₀ = 4,0%

b) Synthese von N-Acetyl-4-[²H]-DL-phenylalanin [162,163]

0,37 g 4-[²H]-DL-Phenylalanin (2,23 mmol) in 0,9 ml 2N NaOH auflösen und abkühlen. Unter ständigem Rühren im Eisbad 8 x je 0,75 ml 2N NaOH und 0,075 ml Ac₂O portionenweise, im Abstand von ca. 2 Minuten, hinzugeben. Ueber Nacht stehen lassen. Mit 6N H₂SO₄ (ca. 2 ml) auf pH 2 - 3 bringen. Abnutschen, mit H₂O waschen und 2 Stunden bei 110°C trocknen.

Rohprodukt: 0,43 g, 91,8% Ausbeute)

aus H₂O krist. Produkt: 0,34 g, 73,2% Ausbeute, Smp. 160°C

DC: R_f = 0,80 (Bedingungen: 0,1 mm F-Cellulose;

Mobile Phase: CHCl₃/MeOH/33% NH₃ 2 : 2 : 1

Laufzeit: ca. 2,5 Std.

c) Racemattrennung

Mittels Acylase I (EC 3.5.1.14) aus Schweinenieren (Fluka). 0,34 g N-Acetyl-4-[²H]-DL-phenylalanin (1,64 mmol) in ca. 7 ml Wasser dest. auflösen. Die Lösung mit LiOH (1N und 0,1N) auf pH 7,0 bringen, dann 0,034 g MnCl₂ (0,17 mmol), 0,0075 g Acylase I (6750 E) dazugeben und auf ca. 17 ml mit Wasser dest. auffüllen. Im Wasserbad bei 37°C unter ständigem Rühren ca. 2 Stunden reagieren lassen, dann noch eine weitere Portion von 0,0037 g Acylase I (3375 E) hinzumischen und nochmals 2 Stunden reagieren lassen. Mit ca. 1 ml 4%-iger 5-Sulfosalicylsäure deproteinisieren und über eine Dowex - 50W x 8 Säule (4,0 ml Volumen) reinigen. Mit Wasser waschen, dann mit 1N NH₄OH eluieren, Fraktionen à 5 ml sammeln (LKB-Fraktionensammler mit UV-Detektor $\lambda = 254$ nm). Diese Methode mit Referenzen ausprobiert, ergab eine 92,5%-ige Ausbeute für L-Phenylalanin und eine 91,8%-ige für N-Acetyl-D-phenylalanin. Die Fraktionen 1 - 6 enthielten N-Ac-4-[²H]-D-phenylalanin und die Fraktionen 13 - 19 4-[²H]-L-Phenylalanin. Die letzteren kombiniert, eingedampft und getrocknet (P₂O₅; 0,01 Torr, 40°C, 15 Std.) ergaben 0,145 g 4-[²H]-L-Phenylalanin (85,5% Ausbeute) Smp. 283°C (Zers.)

DC: Cellulose 0,1 mm (Merck); Mobile Phase: n-PrOH: NH₄OH (33%) = 7 : 3

R_f = 0,67 Laufzeit: ca. 4 Stunden

GC: r_f = 0,55 N-TFA, Me-Ester; Bedingungen siehe Text
(kein anderer Peak vorhanden)

MS: % Deuterium: d₁ = 89,1% d₀ = 10,9% (siehe Abb.34 und 35)

Gesamt-Ausbeute: 69,8%

[²H]₅-L-Phenylalanin -(ringdeuteriert) wurde im Biologischen Institut der Universität Konstanz hergestellt. Der Austausch H/D erfolgte in D₂SO₄/D₂O unter Druck nach Milstien et al. [119]. Die überschüssige Säure wird mit (AcO)₂Ba ausgefällt. Nach der Reinigung über eine Dowex 50W x 8 Säule und Elution mit NH₄OH erhielt man allringdeuteriertes ²H ₅-L-Phenylalanin mit 90% Ausbeute.

Modell Reaktion zur Synthese von [²H]₈-L-Phenylalanin

wurde in Anlehnung an die Arbeit von Tokuhisa et al.[134] mit einigen Änderungen wie folgt ausgeführt:

I) 5,85 g N-Acetyl-glycin (0,05 mol), 3,0 g AcONa wasserfrei (0,037 mol), 7,9 g (7,5 ml) Benzaldehyd (0,074 mol) (frisch im Vacuum unter N₂ destilliert) und 13,4 g (12,4 ml) Ac₂O (0,127 mol) unter ständigem Rühren und

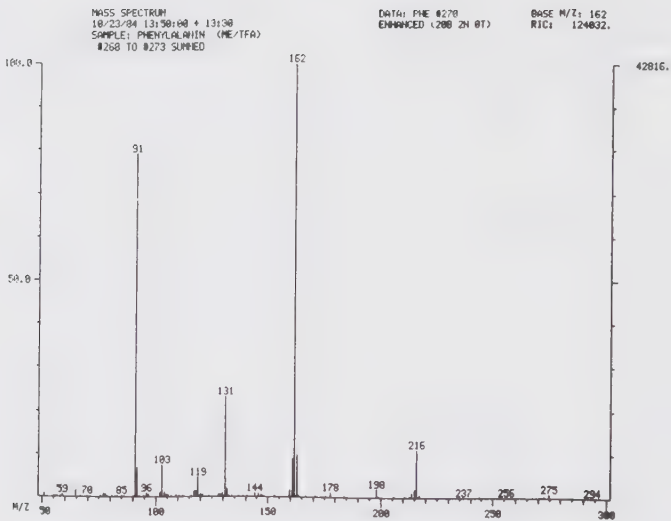


Abb.34 EI-Massenspektrum von L-Phe (Me-TFA)

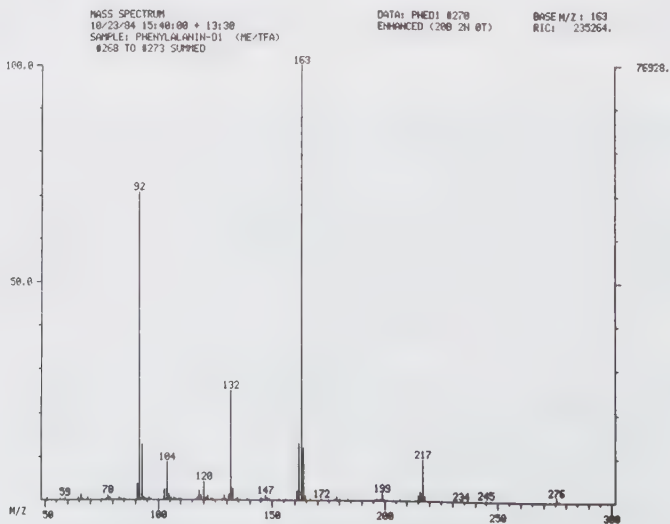


Abb.35 EI-Massenspektrum von 4-[²H]-L-Phe (Me-TFA)

unter Rückfluss erwärmen, bis eine klare gelbliche Lösung entsteht. Dann noch 1 Stunde lang rückflüssieren, abkühlen und über Nacht bei ca. 4°C stehen lassen. Abnutschen, mit Eiswasser waschen und über P₂O₅ im Exsiccator trocknen. Rekrystallisieren aus AcOEt. Erst die zweite Rekrystallisierung ergibt ein sauberes Produkt. Es entsteht ein Azlactonderivat der Zimtsäure (2-Methyl-4-benzal-5-oxazolone) mit 68% Ausbeute.

Katalytische Hydrierung von 1 g kristallinen Azlacton aus I) mit 0,6 g Raney Nickel mit anschliessender Aufarbeitung zum N-Acetyl-DL-phenylalanin ergab 92% Ausbeute.

III) 0,5 g des Racemates N-Acetyl-DL-phenylalanin aus II (2,4 mmol) in 10 ml Wasser aufnehmen und mit LiOH auf pH 7,0 bringen. Dann 0,0494 g MnCl₂ (0,01 mol) und 0,01 g (9000 E) Acylase I, sowie 25 ml Wasser bidest dazugeben. Im Wasserbad bei 37°C während 2 Stunden rühren, dann noch weitere 0,005 g (4'500 E) Acylase I hinzumischen und wieder 2 Stunden lang inkubieren. Auf pH 5,7 bringen und wie 4-[²H]-L-Phe weiterbehandeln. Man erhielt L-Phenylalanin mit 90,5% Ausbeute. Die Gesamtausbeute betrug 56,6%

Auf die Durchführung dieser Synthese mit deuteriertem Benzaldehyd hat man dann aus Kostengründen verzichtet und das [²H]₈-L-Phe bei der Firma MSD gekauft.

2.2.3.5.2 Durchführung der quantitativen Bestimmung mittels der GC-MS/SIM Technik

Die Vorbereitung der Proben war mit derjenigen für die GC-Bestimmung identisch. Als interner Standard wurde jedoch jeweils 5 µg (30,3 nmol) 4-[²H]-L-Phenylalanin (bzw. 500 nmol [²H]₈-L-Phe) und 9,4 µg (50 nmol) [²H]₇-L-Tyrosin dazugemischt. Nach Säulenchromatographie und Derivatisierung wie schon beschrieben wurden die Proben bei folgenden Bedingungen gemessen:

Gaschromatograph: Carlo Erba GI 450, Fractovap 2101 AC

GC-Säule 80 cm, 2 mm i.D.,

2,5 % SE-30 auf Chromosorb G (80- 100 mesh)

Einspritzblock: 250°C

Trärgas: Helium mit 1,0 atm Vordruck

Temperatur: 150°C für L-Phe,

165°C für L-Tyr (isotherm)

Massenspektrometer: Vacuum Generators Micromass 16F mit Data System 2000
 Separator: single jet, 260°C
 Ionenquelle: 220°C
 20 eV, Emission: 50 µA, Electron multiplier voltage 2,5 kV

Finnigan 3200 Gaschromatograph/Massenspektrometer mit Data System 2000
 Trägergas: Helium mit 0,6 atm Vordruck
 GC-Säule: 80 cm (2 mm i.D.) mit 6% OF-1 auf Chromosorb W (80-100 mesh)
 Einspritzblock: 200°C
 Temperatur: 155°C für L-Phe; 165°C für L-Tyr isotherm
 Emission current maximum: 0,25 mA
 Electron energy: 70 eV
 Electron multiplier voltage 1,7 kV

Um die entsprechenden Eichkurven herzustellen, hat man die deuterierten und undeuterierten Aminosäuren in verschiedenen bekannten Verhältnissen gemischt. Die Messwerte für L-Phe (d_0) und 4- $[^2H]$ -L-Phe (d_1) mussten wegen den Isotopenpeakanteilen mathematisch folgendermassen korrigiert werden:
 wenn:

d_0, d_1 -entsprechende Messwerte

(D_0, D_1)-korrigierte Werte wobei (D_0)=100% D_0 und (D_1)=100% D_1

bedeuten, dann:

$$d_0 = (D_0) + 0,12 (D_1)$$

$$d_1 = (D_1) + 0,10 (D_0)$$

d.h. $D_0 = d_0 - 0,12 (D_1)$

$$D_1 = d_1 - 0,10 (D_0)$$

$$D_0 = d_0 - \frac{d_1 - 0,12 d_1}{0,988}$$

$$D_0 = \frac{1}{0,988} d_0 - \frac{0,12}{0,988} d_1$$

$$(D_0) = 100\% D_0 = 1,012 d_0 - 0,121 d_1$$

$$(D_1) = 100\% D_1 = 1,012 d_1 - 0,101 d_0$$

Die somit erhaltenen Eichkurven waren linear im Bereich von 0,05 - 6 µmol L-Phe/Probe bzw. 0,005 - 0,4 µmol L-Tyr/Probe. Dieser Bereich wurde mit Hinblick auf die klinischen Tests ausgewählt (Details siehe Kapitel 5).

Auch die Wahl des [^2H]7-L-Tyr geschah aus den gleichen Gründen.

Die Nachweisgrenzen waren: 0,003 nmol L-Phe/Injektion (d.h. 0,003mM) und 0,0015 nmol L-Tyr/Injektion (d.h. 0,0015mM)

2.2.4 Vergleich der ausgearbeiteten Nachweismethoden

Die Proben für die Enzymaktivitätsbestimmung hat man wie üblich mit einem wenig aktiven "crude extract" inkubiert, die Konzentration von L-Phenylalanin wurde jedoch auf 4mM erhöht um einen Extremfall zu simulieren. Nach der Inkubation wurden die Proben wie beschrieben aufgearbeitet (siehe S.37) Von den Ueberständen wurden 0,6 ml für die Farbreaktion der 1-Nitroso-2-naphthol Methode verwendet. Den Rest der Probe verwendete man für die GC-bzw. SIM-Bestimmung.

GC: ca. 0,6 ml der Probe wurden mit 500 nmol 4-Cl-DL-Phe versetzt, über eine Dowex-Säule chromatographiert, derivatisiert und mit der GC-Methode gemessen.

SIM: ca. 0,6 ml der Probe wurden mit 500 nmol 4- [^2H] -L-Phe und 50 nmol [^2H]7-L-Tyr versetzt, wie für GC aufgearbeitet und mit der SIM-Technik ausgewertet.

Tabelle VIII: Vergleich der Nachweismethoden für den "Enzyme assay"

Probe	Aminosäure	[μmol Aminosäure/Probe]		
		1-Nitroso-2-naphthol	GC	SIM
1	L-Phe	-	2,52	2,73
	L-Tyr	0,024	0,07	0,092
2	L-Phe	-	2,32	2,71
	L-Tyr	0,026	0,08	0,085

2.3 Diskussion und Zusammenfassung

Die Zusammensetzung des optimalsten, also die höchste Enzymaktivität der Phenylalanin-4-Monooxygenase sichernde "Enzym assay" wurde ausgearbeitet. Dabei konnte man auch, nebst dem pH-Wert von 7,6, aus sechs untersuchten Puffersystemen den Natriumphosphatpuffer als den bestgeeigneten ermitteln. Die entscheidende Rolle des Kations im Puffer konnte durch den Vergleich zwischen Na^+ und K^+ in Phosphatpuffern festgelegt werden. Die Bevorzugung des Na^+ durch das Enzym wurde eindeutig bewiesen.

Da die Mehrheit der bis jetzt publizierten Arbeiten über Phenylalanin-4-Monooxygenase den Kaliumphosphatpuffer verwendet, wurde damit die Zufälligkeit einer solchen Pufferwahl bestätigt. Mittels kinetischer Untersuchungen nach Michaelis-Menton und Lineweaver-Burk wurden auch die quantitativen Angaben bezüglich der Konzentration des Substrats, des Cofaktors und des Reduktionsmittels errechnet. Auch die optimale Enzymkonzentration hat man ermittelt. Die positive Auswirkung der Katalase und die Linearität des Assayverlaufs in der Zeit von 30 Minuten bei 37°C wurden geprüft und bestätigt.

Die verschiedenen Messverfahren für das durch die Enzymeinwirkung entstehende L-Tyrosin wurden untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich die direkt in der Küvette ausgeführte UV-Messung nur für die gereinigten Proben eignet. Deswegen wurde sie als Orientationsmethode beim Heraussuchen der enzymhaltigen, unter einer ganzen Reihe von Proben, weiterverwendet. Bessere Ergebnisse lieferte die "indirekte" UV-Messung der Ueberstände aus den "normalen" deproteinisierten Assays. Die 1-Nitroso-2-naphthol Farbkomplex Bildung hat sich als zuverlässige, obwohl für L-Tyrosin nicht spezifische und zu niedrige Werte liefernde Messmethode, behauptet. Als sehr spezifische und genaue Bestimmung des L-Tyrosins mit gleichzeitigem Erfassen des L-Phenylalanins wurde eine gaschromatographische Methode ausgearbeitet. Aus mehreren hergestellten und untersuchten Derivaten wurden die Trifluoracetyl, methylester als die bestgeeigneten ausgewählt. Auf Grund der GC-Messmethode konnte die Produktkontrolle der enzymatischen Hydroxylierung des L-Phenylalanins genau durchgeführt werden. Als Ergebnis wurde lediglich L-Tyrosin (4-Hydroxy-L-phenylalanin) als einziges vorhandenes Isomere festgestellt. Die deuterium-markierten Verbindungen, nämlich 3,5- $[^2\text{H}]_2$ -L-Tyrosin und 4- $[^2\text{H}]$ -L-Phenylalanin sind synthetisiert worden. Ein Weg für die Synthese von $[^2\text{H}]_8$ -L-Phenylalanin wurde mit unmarkierten Substraten geprüft (S. 65).

Die GC-MS/SIM Messung des L-Phenylalanins und des L-Tyrosins wurde als eine alternative Messmethode für besondere Fälle ausgearbeitet. Ein empirischer Vergleich zeige gute Uebereinstimmung zwischen GC und SIM-Bestimmungen und ca. 50% tiefer liegende Ergebnisse bei der 1-Nitroso-2-naphthol Methode. Bei der GC-Nachweismethode (und auch in der GC-MS Kombination) ist die Säulenchromatographie mit Ionenaustauscher der am meisten zeitraubende Teil des Verfahrens. Durch die Anwendung der HPLC (High pressure liquid chromatography)-Technik könnte dieser wesentlich verkürzt und vereinfacht werden. Gleichzeitig würde man damit eine Vortrennung des Phenylalanins vom Tyrosin erreichen. Die Bedingungen für solche Chromatographie wurden durch eine japanische Forschergruppe veröffentlicht [164].

3. ISOLIERUNG UND REINIGUNG DES ENZYMS

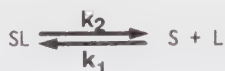
3.1. Theoretischer Teil

Unter Isolierung des Enzyms wird seine Extraktion aus dem Gewebe, Zellkultur etc., verstanden. Um ein Enzym zu reinigen, muss man das isolierte Material von den unerwünschten Anteilen befreien, d.h., man muss die Proteine und anderen Substanzen, die die Aktivität des gesuchten Enzyms gar nicht oder negativ beeinflussen entfernen. Das Ziel einer solchen Arbeit besteht darin, ein Präparat mit einer möglichst hohen Enzymaktivität bei einem möglichst niedrigen Proteingehalt herzustellen. Für die Phenylalanin-4-Monooxygenase wurden diesbezüglich mehrere Arbeiten publiziert. Noch vor kurzem stützten sich alle auf die konventionellen, d.h. auch für andere Enzyme anwendbaren Reinigungsmethoden. Darunter war jedoch kein Verfahren, das auf einfache Weise ein weitgehend reines Enzym geliefert hätte. Am meisten verwendet wurde das Verfahren nach Kaufman et al. [165], das nach siebenstufiger Reinigung ein ca. 85% reines Enzym mit 4,6% Ausbeute (Angabe der Autoren), ergab. Die detaillierten Schritte dieser Methode werden im Kapitel 3.2.1. noch beschrieben. Eine der ersten modernen Reinigungstechniken wendete die Affinitätschromatographie an.

Affinitätschromatographie, (affinis lat. - verwandt)

auch "bioaffinity" oder "specific affinity chromatography" genannt, ist eine relativ neue, erst seit 1967 existierende Technik und wurde erstmals 1968 von Cuatrecasas et al. [166] zur Proteinreinigung verwendet. Die Vorteile dieser Methode liegen schon im Grundprinzip: Während sich die konventionellen Methoden der Proteinreinigung auf relativ geringe Unterschiede in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine im Gemisch stützen, benutzt die Affinitätschromatographie die einzigartige biologische Eigenschaft der Proteine, spezielle Liganden spezifisch, stabil und reversibel zu binden. Wenn einer der beiden Partner solcher Komplexe immobilisiert wird, entsteht ein für den anderen Partner spezifisches Sorbent, vorausgesetzt, dass die Arbeitsbedingungen die Entstehung eines solchen Komplexes begünstigen. Auf diese Weise kann aus dem Proteingemisch ein Bestandteil selektiv zurückgehalten und dadurch von den anderen "gereinigt" werden. Die nachfolgende Elution, die eine Dissoziation des Komplexes hervorrufen soll, liefert das gereinigte gewünschte Protein. Die physikalischen Grundlagen dieser Methode wurden durch Turková [167] beschrieben.

Die Hauptreaktion der Methode kann mit der Gleichung:



wobei S = Substanz
L = Ligand

und der Gleichgewichtskonstante: $K_L = \frac{[S][L]}{[SL]}$
beschrieben werden.

Wenn L_0 = Affinitätsligand mit der Matrix gebunden vor der Zugabe der Probe in (mol/V) repräsentiert, ist

$$\frac{S \text{ gebunden}}{S \text{ total}} = \frac{L_0}{K + L_0}$$

Die genauen Arbeitsbedingungen konnte man schliesslich der Broschüre des Matrixproduzenten "Pharmacia" 168 entnehmen. Um die Zugänglichkeit des Liganden für das Enzym (oder ein anderes Protein) zu erhöhen, baut man zwischen ihm und der Matrix einen sogenannten "Spacer arm" ein.

Das Prinzip der Affinitätschromatographie wird auf der folgenden Abbildung dargestellt:

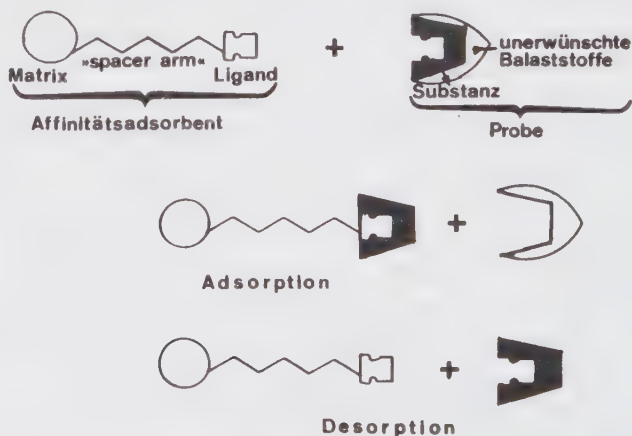


Abb.36 Prinzip der Affinitätschromatographie

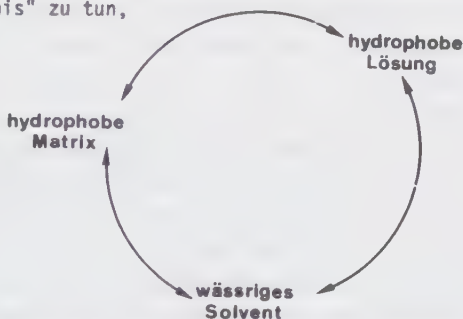
Die folgenden Bedingungen sind Voraussetzung, um diese Methode verwenden zu können:

1. Günstiger Ligand L
2. Der Ligand L kann über eine sp-Bindung kovalent an die Matrix gebunden werden
3. Der Ligand bleibt nach der Bindung für die Substanz S spezifisch
4. Die selektiven Desorptionsmethoden, die erlauben die Substanz S aktiv zu eluieren, sind realisierbar.

Mit dieser Methode kann man, falls korrekt angewendet, nicht selten eine bis zu tausendfache Reinigung erreichen. Die Methode erlaubt auch die Konzentrierung von grösseren Volumen der Substanz. S. Cotton et al. [169] haben diese Methode für die Reinigung der Phenylalanin-4-Monooxygenase angewendet, wobei ein Tetrahydropterin-Derivat als Ligand benützt wurde. Genauere Angaben darüber werden im Kapitel 3.2.2 gemacht.

Neuerdings hat man sich die hydrophobe Chromatographie zu Nutzen gemacht und mit dieser Technik das Enzym gereinigt.

Hydrophobe Chromatographie, ($\upsilon\acute{o}\omega\grave{\alpha}$ gr. = Wasser; $\phi\acute{o}\beta\omicron\varsigma$ gr. = Furcht) oder "Hydrophobic interaction chromatography" nützt, wie dem Namen zu entnehmen ist, die hydrophoben Kräfte aus. Man hat es hier mit einem "Drei-Grössen-Verhältnis" zu tun,



das durch folgende Störfaktoren beeinflusst werden könnte: Ionentyp, Ionenstärke, Polarität des Eluents, Detergent-Anwesenheit, pH und Temperatur [170]. Was z.B. den Einfluss des Ionentyps betrifft, konnte man folgende Reihen zusammenstellen:

"salting out Effekt"

PO_4^{3-} ; SO_4^{2-} ; CH_3COO^- ; Cl^- ; Br^- ; NO_3^- ; ClO_4^- ; I^- ; SCN^- ;
 NH_4^+ ; Rb^+ ; K^+ ; Na^+ ; Cs^+ ; Li^+ ; Mg^{2+} ; Ca^{2+} ; Ba^{2+} ;

"chaotropic Effekt"

wobei der "salting out" Effekt die Erhöhung der hydrophoben Interaktion hervorruft und der "chaotropic" Effekt sie herabsetzt. Shiman et al. [21,22] haben die Phenylalanin-4-Monooxygenase mittels hydrophober Chromatographie gereinigt, worüber noch näher im Kapitel 3.2.3. berichtet wird.

3.2 Experimenteller Teil

Da zur Zeit des Arbeitsbeginns diese letztere Technik, d.h. die hydrophobe Chromatographie, noch nicht für die Phenylalanin-4-Monooxygenase publiziert worden ist, hat man mit älteren Methoden angefangen.

3.2.1 Klassisches Verfahren

Das auf allgemein üblichen Enzymreinigungsmethoden aufgebaute Verfahren nach Kaufman et al. [165] wurde zuerst nachgearbeitet. Es umfasst die folgenden 7 Stufen:

1. Herstellung des "crude extract's"
2. Fraktionierung mit EtOH
3. Erste $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Ausfällung
4. Kalziumphosphatgel Reinigung
5. Zweite $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Ausfällung und Sephadex G-25 Säule
6. DEAE-Cellulose Säule
7. Sephadex G-200 Säule

Alle Schritte wurden bei $+4^\circ\text{C}$ ausgeführt, die Zugabe der Reagenzien erfolgte unter ständigem Rühren. Wenn nötig, konnte das Verfahren durch schnelles Einfrieren der Fraktion (in Aceton/Trockeneis) unterbrochen werden. Die Fraktionen wurden dann bei -80°C aufbewahrt.

Die Art der Leberaufbewahrung spielt für die Enzymaktivität auch eine grosse Rolle. Sofort nach der Entnahme taucht man sie in flüssigen Stickstoff ein und transportiert sie auch auf diese Weise. Die parallel durchgeführten Versuche mit Einfrieren in Aceton/Trockeneis Gemisch oder durch Abkühlen auf vereisten Pufferwürfeln erbrachten bis zu 30% Aktivitätsverlust.

Ad.I) Die eingefrorenen Rattenlebern (Albinoratten Zbz Zucht) wurden im Kühlraum aufgetaut, von Hand zerkleinert, gewogen und dann 30 Sekunden im "Virtis- Homogenizer" mit 1,5 Volumen kalter 0,01M AcOH/g Leber bei ca. 3/4 Geschwindigkeit homogenisiert. Die gleiche Portion AcOH wurde nochmals zugegeben und das Ganze nochmals 30 Sekunden bei 1/2 Geschwindigkeit weiter homogenisiert. Das Homogenat wurde bei $17'369 \times \text{g}$ (ca. $12'000 \text{ rpm}$) in einer Sorvall- Kühlzentrifuge während 45 Minuten abzentrifugiert und das Sediment verworfen.

Ad II.) Ethanol wurde zuerst bis auf ca -30°C bis -40°C abgekühlt. Zum "crude extract" von I.) fügte man unter Rühren zuerst eine Menge EtOH hinzu, die eine Endkonzentration von 10% (V/V) bei der Temperatur von -20°C ergab. Der Niederschlag wurde, nach dem Zentrifugieren bei $4'000 \times \text{g}$ während 15 Minuten, entfernt und der Ueberstand mit EtOH bis auf eine Endkonzentration von 21% gebracht. Erst dieser Niederschlag enthielt den grössten

Teil der Enzymaktivität und wurde nach dem Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen in 0,033M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 (Volumen = 1/4 des "crude extract's" Volumens) aufgenommen.

Ad.III.) 20,3 g festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde der obigen Lösung pro 100 ml zuge-mischt und während 20 Minuten bei 18'000 x g zentrifugiert. Zum Ueberstand gab man nochmals $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, und zwar 5,6 g/100 ml der Ausgangslösung hinzu. Nach dem Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen wird das Sediment in 0,033M Trispuffer (pH 6,8) aufgenommen und zwar in ca. 1/4 des Startvolu-mens der Ausgangslösung.

Ad.IV.) Pro 100 ml der Lösung aus der vorigen Stufe wurden 10 ml einer kalten 0,1M L-Phenylalanin-Lösung und dann noch 100 ml kalten Wassers zuge-mischt. Dann folgte das Kalziumphosphatgel, und zwar 1/3 des Gesamtvolumens der oben genannten Zugaben. Das Gel enthielt 20 mg fester Substanz pro 1 ml. Die Zumischung des Gels erfolgte sehr langsam während insgesamt ca. 15 Minuten und unter ständigem Rühren. Danach wird das Ganze noch weitere 10 Minuten gerührt. Das Gel mit dem adsorbierten Enzym wird abzentrifugiert (15 Minuten bei 18'000 x g) und zuerst mit 0,02M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 (Volumen = Gesamtvolumen der Ausgangslösung), während 15 minütigem Rühren gewaschen. Dieses Eluat wird verworfen. Zur weiteren Elution werden ca 3/4 des Ausgangsvolumens des 0,1M Kaliumphosphatpuffers, pH 6,8, ange-wendet.

Ad.V.) Das Eluat aus Stufe IV wird durch eine zweite $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Ausfällung konzentriert und von Phosphaten befreit. Zuerst werden 18,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro 100 ml Eluat hinzugegeben und der Niederschlag wird verworfen. Die nächsten 7,35 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro 100 ml des Eluats werden zugemischt und der abzentri-fugierte Niederschlag (Bedingungen wie Stufe III), wird in (1/40 des Eluat-volumens) 0,01M Trispuffer pH 7,0 aufgelöst. In 0,005M Tris-Puffer, pH 7,0 suspendiertes Sephadex G-25 wird in eine Glassäule (Pharmacia, V = 4,1 ml) gefüllt und mit dem gleichen Puffer gewaschen. Nach dem Auftragen der Lö-sung aus der zweiten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Ausfällung eluiert man das Enzym mit 0,005M Trispuffer pH 7,0, und sammelt ca. 1 ml Fraktionen.

Ad.VI.) Eine DEAE-Cellulose Säule wird mit 0,005M Trispuffer pH 7,0 äqui-libriert. Pro ca. 1,5 g Proteingehalt im Eluat aus Stufe V benötigt man ca. 110 ml Säulenvolumen (z.B. 40 cm x 1,9 cm). Es wird mit einem Gradient-Elu-tions-Apparat nach Peterson und Sober 171 eluiert. Zwei Flaschen mit gleichem Durchmesser enthalten 300 ml 0,01M Trispuffer pH 7,0, respektive 300 ml 0,01M Trispuffer pH 7,0 mit 0,22M KCl. Die Flaschen werden mitein-

ander verbunden. Die Sammelröhrchen enthalten 0,03 ml 3M KCl, was am Ende (da 0,6 ml Fraktionen gesammelt werden), eine ca. 0,15M Konzentration des KCl in den Röhrchen ergibt (der Effluent ist nicht berücksichtigt). Das Enzym wird mit ca. 30 ml eluiert. Die Konzentration der Proben wurde mit Sartorius Ultrafiltrations-Membranen durchgeführt.

Ad.VII.) Eine Sephadex G-200 Säule wird mit 0,01M Trispuffer/0,1M KCl pH 7,0 äquibriert. Pro 20-40 mg Proteingehalt im Eluat von Stufe VI wird ca. 30 cm³ Säulenvolumen benötigt. Mit dem gleichen Puffer wie bei der Äquilibriumierung wird das Enzym eluiert. Die meiste Aktivität des Enzyms wird bei 15-20 ml Eluat gemessen. Für eine gute Ausbeute in dieser Stufe ist das Verhältnis Proteingehalt : Volumen des Sephadex kritisch, es muss zumindest 0,7 mg/cm³ betragen. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden wiederum mit Sartorius Ultrafiltrations-Membranen konzentriert.

Das folgende Protokoll zeigt den Verlauf dieser Reinigungsprozedur:

Tab.IX Verlauf der Enzymreinigung beim klassischen Verfahren

	Volumen [ml]	Aktivität [E/ml]	Proteingehalt Gesamt[E]	Proteingehalt [mg/ml]	Spez.Aktiv. Gesamt[mg]	Spez.Aktiv. [E/mg Prot.]	Ausbeute [%]	Anreicherung
1	300	0,156	46,8	30,59	9176	0,0051	100	
2	75	0,68	50,8	111,0	8328	0,0061	108,5	1,2
3	19	2,45	46,6	191,6	3640	0,0128	99,5	2,5
4	30	0,67	20,1	11,95	358	0,0561	43,0	11
5	2	6.65	13.3	93.1	186	0.0714	28.4	14
6	45	0,076	3,4	0,285	12,82	0,265	7,3	52
7	5	0,168	0,84	0,397	1,99	0,4231	1,8	83

(Wobei 1 Enzymaktivitätseinheit (1E) der Menge des Enzyms entspricht, die 1 µmol L-Tyrosin pro Minute produziert.)

Der Assay wurde wie folgt durchgeführt:

0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,6

1,0mM L-Phenylalanin

290 E Katalase

6mM Dithiothreitol

0.7mM 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin

1 Minute bei 37°C äquibriert (die Aktivierung wurde erst später durch Shiman et al.[21] eingeführt), dann 0,1 ml Enzymlösung hinzugegeben und

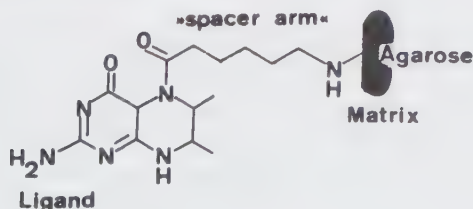
weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. 0,2 ml 4%-iger (V/V) 5-Sulfosalicylsäurelösung hinzufügen und 10 Minuten stehen lassen. 20 Minuten bei 2'000 x g zentrifugieren und den Ueberstand mit der 1-Nitroso-2-naphthol Methode messen (siehe Kapitel 2.2.3.1). Der Proteingehalt wird mit der Micro-Biuret Methode (siehe Kapitel 2.2.2) gemessen.

3.2.2 Affinitätschromatographie

Wie bereits erwähnt, wurde diese Technik für die Phenylalanin-4-Monooxygenase Reinigung zuerst durch Cotton [169] beschrieben. Die allererste Version benötigte jedoch noch vier zusätzliche Vorreinigungsstufen (Herstellung des "crude extract's", Protaminsulfatausfällung, Ethanolausfällung und Ammoniumsulfatausfällung). Diese wurden in früheren Arbeiten von Cotton [28], die sich noch mit konventionellen Reinigungsmethoden befasst haben, ausgearbeitet. In der neueren Modifizierung [135] wurde die Handhabung um einiges vereinfacht und beschränkt sich auf die folgenden Stufen:

1. Herstellung des "crude extract's"
2. Affinitätschromatographie
3. Konzentrierung des Enzyms

Als Affinitätsgel (Matrix) wurde CH-Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden) verwendet. Dies ist eine Agarose, die mit Cyanbromid-Reaktion aktiviert worden ist, d.h., die Hydroxylgruppen der Agarose wurden in Iminoäther umgewandelt. Durch diese Aktivierung kann 6-Aminohexansäure als "spacer arm" eingebaut werden. 1-Ethyl-3-(3'-N-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) bildet aus der freien Carboxylgruppen der CH-Sepharose 4B und dem Amin-Stickstoff-N(5) des Tetrahydropterinderivates ein Säureamid [172]. Auf diesem Wege erhält man das erwünschte Affinitätsadsorbens.



Ad.I.) Die Rattenlebern wurden nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und darin transportiert. Im Kühlraum partiell aufgetaut, wurden sie von Hand zerkleinert und abgewogen. Mittels "Virtis-Homogenizer" (30 Sekunden bei halber Geschwindigkeit und weitere 30 Sekunden bei voller

Geschwindigkeit), wurde in 0,1M Tris-HCl Puffer pH 8,6 (4 ml/g Leber) ein Homogenat hergestellt. Der durch Zentrifugieren in einer Sorvall-Kühlzentrifuge während 60 Minuten bei ca. $21'000 \times g$ erhaltene Ueberstand wurde über Gaze (zum Entfernen der Lipide) filtriert und weiterverwendet oder schnell eingefroren (Aceton/Trockeneis Gemisch) und bei -80°C gelagert.

Ad.II.) Das Affinitätsgel wurde wie folgt vorbereitet: CH-Sepharose wurde nach Bedarf abgewogen (0,5 g Trockensubstanz ergibt ca. 2 ml Gel), in 0,5M NaCl suspendiert (200 ml Lösung/g Pulver) und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen (um Lactose und Dextran zu entfernen). Das Ganze bringt man auf eine Glassäule mit Fritte und entfernt anschliessend das NaCl durch ausgiebiges Waschen mit dest. Wasser (Kontrolle des Effluents mit AgNO_3). Danach wird die Sepharose in einen Erlenmeyer Kolben mit Wasser übertragen und ca. 30 Minuten mit perlendem Stickstoff begast. Die benötigte Menge 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (22 mg/0,67 g Trockengel) wird rasch abgewogen, in Wasser aufgelöst (ca. 2 ml H_2O /22 mg) und dann ebenfalls 30 Minuten lang mit Stickstoff begast. Danach wird die Cofaktor-Lösung der Gelsuspension zugemischt, das pH auf 5,0 gebracht und (unter Stickstoff verschlossen), ca. 4 Stunden lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Das EDC (1-Ethyl-3(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) wird in Pulverform auf die Endkonzentration von 0,1M hinzugemischt. Auf pH zwischen 4,5 - 6,0 gebracht (nach 1 Stunde pH Kontrolle), wird das Ganze behutsam während 24 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Mit 0,025M NaHCO_3 /NaOH-Puffer pH 10,9 (mit 1M NaCl und 2mM Dithiothreitol) gewaschen, wird das Gemisch noch zusätzlich mit 0,01M Natriumacetatpuffer pH 4,0 (mit 1M NaCl und 2mM Dithiothreitol) gewaschen. Waschpufferspuren werden mit H_2O dest. entfernt. Wenn nicht sofort verwendet, soll ein so vorbereitetes Affinitätsgel im oben erwähnten Acetatpuffer bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

Eine Pharmacia-Glassäule (1,1 cm i.D.) wird zuerst mit ca. 15 ml Sephadex G-25 aufgefüllt. Nachdem sich dieses gesetzt hat, wird erst das Affinitätsgel (5 ml) aufgetragen. Die Säule wird dann mit 30 ml frischvorbereitetem Säulenpuffer I (0,05M Tris-HCl pH 7,6; 2mM DTT; 0,1mM $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$; 20% Glycerin und 0,8M NaCl) äquilibriert. Zum "crude extract" wird NaCl (auf 0,8M Endkonzentration), DTT (auf 2mM) und $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ (auf 0,1mM) zugemischt. Das so vorbehandelte "crude extract" (ca. 30 ml Volumen mit einem Proteingehalt von ca. 40 mg/ml auf die angegebene Säulengrösse), wird mit einer Durchflussgeschwindigkeit von ca. 24 ml/h auf die Säule aufgetragen und mit gleichem Volumen des Säulenpuffers I, wie dasjenige des "crude extract's", gefolgt von 2/3 des Volumens des Säulenpuffers II (unterschiedlich nur in der NaCl Konzentration, nämlich 0,2M NaCl), gewaschen.

Die Elution wurde mit folgendem Puffer durchgeführt: 0,05M Tris-HCl, pH 7,6; 2mM DTT; 0,1mM EDTA-Na₂; 20% Glycerin; 0,2M NaCl und 100mM L-Phenylalanin. Das Volumen des Elutionspuffers soll dem Volumen des vorbehandelten "crude extract's" entsprechen. Es folgte noch ein zweiter Puffer, nämlich: 0,25M Na₂HPO₄/NaOH pH 11,3; 1M NaCl und 2mM DTT. 6 ml Fraktionen werden gesammelt bis das gemessene pH des Effluents den Wert über 9,0 erreicht. Die Regenerierung der Säule sollte durch Waschen mit dem letzten Puffer erfolgen und anschliessend noch mit 0,1M AcONa-Puffer, pH 4,0; 1M NaCl und 2mM DTT vervollständigt werden.

Ad.III.) Die aktiven Fraktionen aus der Affinitätschromatographie werden bei +4°C zusammengemischt und mit einem Sartorius Membranenfilter (M_r off 25'000) konzentriert. Bei diesem Prozess konnte man gleichzeitig die Dialyse der Proben zu dem stabilisierenden Puffersystem (0,01M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0; 0,1mM EDTA-Na₂; 10mM L-Phenylalanin; 20% Glycerin) durchführen.

Ein typisches Protokoll eines solchen Verfahrens zeigt die folgende Tabelle:

Tab.X Verlauf der Enzymreinigung mit Affinitätschromatographie

	Vol.	Aktivität		Proteingehalt		Spez.Aktiv.	Ausbeute	Anreiche-
	[ml]	[E/ml]	Gesamt[E]	[mg/ml]	Gesamt[mg]	[E/mg Prot.]	[%]	rung
I	30	0,195	5,85	43,06	1291,8	0,0045	100	
II+}	1,2	1,009	1,21	1,02	1,22	0,99	21	220
III}(nur Peak 2)								

Sowohl die Zusammensetzung des Assays wie auch die nachfolgende Messung des entstandenen L-Tyrosins waren identisch mit Kapitel 3.2.1.

Zu erklären bliebe noch, dass die Elutionsmuster nicht einheitlich sind. Das heisst, nicht die ganze Aktivität des Enzyms wird in einer Fraktionen-
gruppe (Peak) eluiert. Der im Protokoll erwähnte Peak 2 entspricht z.B.
fünf Fraktionen à 6 ml. Er wird jedoch noch von einem Peak 3 mit 12 ml
Volumen (also aus 2 Fraktionen bestehend) gefolgt, worin ca. 3% der Gesamt-
aktivität vorhanden sind.

3.2.3 Hydrophobe Chromatographie

Als erste hatten Shiman et al. [21,22] die hydrophobe Chromatographie zur Reinigung der Phenylalanin-4-Monooxygenase angewendet, nachdem sie festgestellt haben, dass in Gegenwart seines Substrates (des L-Phenylalanins) das Enzym aus Rattenleber sehr fest durch die mit hydrophoben Gruppen besetzte Agarose gebunden wird. Die Phenyl-Sepharose, die als eigentliche hydrophobe Matrix hierfür benutzt wird, besitzt ein Agarose-Skelett, das durch ätherische Bindungen mit Phenylgruppen belegt worden ist (siehe Abb.39). Das aktivierte Enzym zeigte keine Affinität zur freien Agarose. Für die hydrophobe Art der Adsorption der Phenylalanin-4-Monooxygenase an der Phenyl-Sepharose CL-4B spricht die Tatsache, dass die quantitative Elution dieses Enzyms nicht nur durch das Absetzen von L-Phenylalanin in der Zusammensetzung des Elutionspuffers stattfindet, sondern sogar in Gegenwart von L-Phenylalanin durch Zugabe von 10% Dimethylformamid, 1% Tween 80 oder auch 50% Glycerin geschieht. Alle diese erwähnten Substanzen sind für die Abschwächung der hydrophoben Interaktionen bekannt. Die Erhöhung der Ionenstärke durch Zumischung von z.B. 0,2M KCl zum Elutionspuffer verlangsamt die Desorption des Enzyms (um ca. 75%).

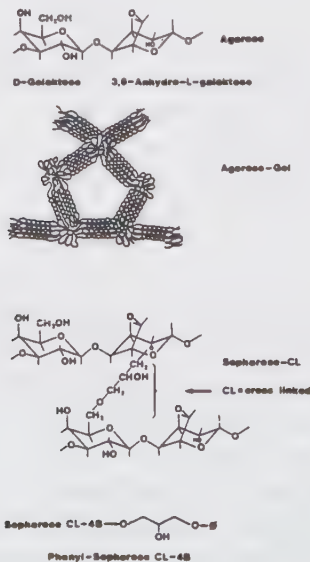


Abb.37 Struktur der angewendeten hydrophoben Matrix

Das ganze Verfahren, das auf der hydrophoben Chromatographie basiert, hat man mit den vier folgenden Schritten durchgeführt, wobei alle Operationen wie immer bei +4°C vollzogen worden sind.

1. Herstellung des "crude extract's"
2. Aktivierung des "crude extract's"
3. Hydrophobe Interaktion-Chromatographie
4. Konzentrierung des Enzyms

Ad.I.) Die Rattenlebern wurden nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und darin transportiert. Im Kühlraum partiell aufgetaut, kleingeschnitten und abgewogen, wurden sie mit einem "Virtis-Homogenizer" (2 x 30 Sekunden volle Geschwindigkeit) und anschliessend noch mit einem "Braun-Potter" (2 x 30 Sekunden) im Homogenisierungspuffer (0,2M KCl; 0,02M L-Phe; 0,03M Tris-HCl pH 7,25) homogenisiert. Man nahm 4 ml des Homogenisierungspuffers pro 1 g Leber. Das Homogenat wurde während 30 Minuten bei 40'000 x g (18'250 rpm) in einer Sorvall Kühltzentrifuge zentrifugiert. Den Niederschlag hat man nochmals im gleichen Puffer homogenisiert (1 ml/g Leber) und gleich weiterverarbeitet. Beide Ueberstände wurden zusammen gemischt und weiter gereinigt.

Ad.II.) Das "crude extract" wurde in einem Wasserbad unter ständigem Rühren schnell auf 25°C erwärmt und bei dieser Temperatur weitere 20 Minuten lang aktiviert. Anschliessend wurde es schnell auf 0°C abgekühlt und weiterverwendet, bzw. bei -80°C gelagert.

Ad.III.) Vor dem nächsten Schritt wird das aufgetaute aktivierte "crude extract" nochmals während 20 Minuten bei 40'000 x g zentrifugiert. Da bei Shiman die aktivierten "crude extracts" meistens ca. 20 mg/ml Proteine enthalten, und die unsrigen ca. 30-40 mg Protein/ml hatten, wurden die Proben vor der weiteren Reinigung 1 : 1 mit Homogenisierungspuffer verdünnt. Dann erfolgte, (wie nach jedem Zentrifugieren oder Verdünnen), die Reaktivierung des Enzyms durch schnelles Erwärmen auf 25°C und unter Rühren für weitere 4 Minuten bei gleicher Temperatur. Danach wird rasch auf 0°C abgekühlt.

Inzwischen wird eine Pharmacia-Glassäule mit Phenyl-Sepharose CL-4B gefüllt. Die besten Resultate erzielte man bei einem Verhältnis Volumen des aktivierten "crude extract's" zu Volumen der hydrophoben Matrix von 3,3 - 3,5. Kurz vor Gebrauch wird die Säule mit dem zweifachen Säulenvolumen Aequilibrationspuffer (0,2M KCl, 0,02M L-Phe; 0,03M Tris-HCl pH 7,25; 0,1% G/V Tween 80), gewaschen, und zwar mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 3-4 Säulenvolumen/Stunde. Das reaktivierte "crude extract" wird mit

Tween 80 auf eine Endkonzentration von 0,1% (G/V) gebracht und sofort mit gleicher Durchflussgeschwindigkeit auf die Säule aufgetragen. Es folgt das Waschen mit einem Säulenvolumen des Homogenisierungspuffers; 10 Volumen des Waschpuffers I (0,2M KCl; 0,02M L-Phe; 0,03M Tris-HCl pH 2,5, 4,8% Dimethylformamid) und schliesslich 10 Volumen Waschpuffer II (0,01M L-Phe, 0,05mM EDTA·Na₂; 0,03M Tris-HCl pH 7,25; 0,037% G/V Tween 80 und 15% V/V Glycerin) bei gleichbleibender Durchflussgeschwindigkeit. Die Elution wird mit dem Elutionspuffer (0,05mM EDTA·Na₂; 0,03M Tris-HCl pH 7,25; 0,037% G/V Tween 80 und 15% V/V Glycerin) und zwar nach ca. 10 Säulenvolumen und einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 Säulenvolumen/Stunde durchgeführt. Fraktionen à 10 ml wurden gesammelt und die enzymhaltigen Fraktionen mittels "direkter" UV-Messung (siehe Kapitel 2.2.3.2) ermittelt. Die Elution konnte notfalls unterbrochen werden, indem man 1,5 Säulenvolumen des Homogenisierungspuffers durch die Säule pumpte und dann den Durchfluss des Solvents unterbrach. Die aktiven Fraktionen wurden zusammengemischt, die Aktivität gemessen, der Proteingehalt nach der Lowry-Methode (siehe Kapitel 2.2.2) bestimmt und sofort eingefroren (Aceton/Trockeneis). Aufbewahrung bei -80°C.

Das Profil des Proteingehalts und der Enzymaktivität im Eluat wird in der nächsten Abbildung dargestellt. (Der Proteingehalt wird nach Warburg und Christian ermittelt - Kapitel 2.2.2).

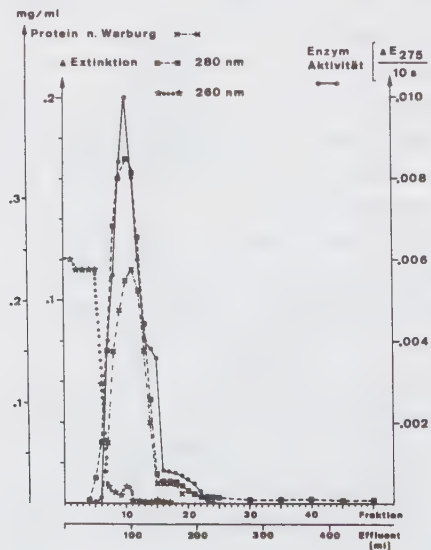


Abb.38 Verlauf der Enzymreinigung bei der hydrophoben Chromatographie

Ad.IV.) Die Konzentration der Proben erfolgte mit einem Sartorius Ultrahül-
sen Gerät, das 10 - 20-fach konzentrierte Enzympräparate lieferte, oder
nach Shiman, mittels einer Whatman DE 52 Säule. Die Säule wurde zuerst mit
einem Puffer (0,05mM EDTA·Na₂; 0,03M Tris-HCl pH 7,25; 15% V/V Glycerin)
äquilibriert. Die Elution erfolgte mit einem 150 ml Lineargradient von
0 - 0,4M KCl im gleichen Puffer gelöst. Das Eluat zeigte eine ca. 2 - 3-
fache Konzentrierung des Enzyms.

Ein typisches Reinigungsprotokoll zeigt den Verlauf dieses Verfahrens in
Zahlen.

Tabelle XI Verlauf der Enzymreinigung bei der hydrophoben Chromatographie

Stufe:	Vol. [ml]	Aktivität [E/ml]	Gesamt	Proteingehalt [mg/ml]	Spez.Aktiv. [mg Prot.]	Ausb. [%]	Anreiche- rung
II	131	0,86	112,7	15,2	1991	0,057	100
Probe- effluent	142	0,016	2,25	-	-		2
Wasch- effluente	885	0,013	11,5				10
Fr. 6-15	95	0,83	78,9	0,068	6,45	12,2	70 214
Fr.16-23	76	0,237	18,0	0,025	1,9	9,5	16 167

Alle Puffer müssen genau eingehaltene pH Werte (bei Arbeitstemperatur d.h.
+4°C) haben. Die glycerinhaltigen Puffer sollen immer ganz frisch, kurz vor
Gebrauch, vorbereitet werden.

Regenerierung der Säule

Die Regenerierung wird bei Zimmertemperatur wie folgt durchgeführt:

1. Elutionspuffer (bis die rot-gelbliche Verfärbung der Säule vollkommen
verschwindet)
2. Wasser
3. 5%-ige Lösung von SDS (Natriumdodecylsulfat) um die adsorbierten Prote-
ine und Lipide zu entfernen.
4. Wasser
5. EtOH, n-BuOH, EtOH, Wasser

Dann wird die Phenyl-Sepharose-CL-4B mit 20mM EDTA-Na₂-Lösung pH 7,0 ca. 10 Minuten bei 90°C geheizt, um die Entfernung aller gebundenen Metalle zu sichern und anschliessend in 1mM EDTA-Na₂-Lösung, pH 7,0 suspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

Der Assay wird wie folgt durchgeführt:

0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,6

1,0mM L-Phenylalanin

0,1 ml Enzymlösung

3 Minuten bei 37°C aktivieren

290 E Katalase

6mM Dithiothreitol

0,7mM 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin

30 Minuten bei 37°C inkubieren

Mit 0,2 ml CCl₃COOH enteiweissen und 10 Minuten stehen lassen. Dann 20 Minuten lang bei 2'000 x g zentrifugieren und den Ueberstand zur Tyrosinbestimmung verwenden. (Um einen Vergleich mit den Verfahren 3.2.1 und 3.2.2 zu ermöglichen, wurden diese Assays und damit auch die im obigen Protokoll angegebenen Werte mit der 1-Nitroso-2-naphthol Methode ermittelt).

Die Reinheit des Enzyms aus diesem Verfahren wurde durch Shiman et al. [21,22] in der Polyacrylamid Gelelektrophorese auf SDS-haltigem Gel (10% Acrylamid) nach Laemmli [173] untersucht und nach Weber et al. [174] mit Coomassie brilliant blue gefärbt. Nach der Entfärbung wurde die Reinheit des Proteins durch Densitometrie bei $\lambda = 600$ nm mittels Gilford-linear-transport bestimmt. Die Erzeugung von Antikörpern beim Schaf mit anschliessender Immunelektrophorese bestätigte die Identität des isolierten Proteins als Phenylalanin-4-Monooxygenase [175].

3.3. Diskussion und Zusammenfassung

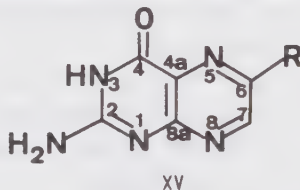
Auf Grund der hier durchgeführten Arbeiten ergab sich die Möglichkeit, drei vollkommen verschiedene Verfahren der Enzymreinigung miteinander zu vergleichen. Die Prozedur der klassischen Enzymreinigung hat sich als sehr langwierig und zeitraubend gezeigt. Was die Resultate anbelangt, so war die Ausbeute jeweils sehr klein und der Reinigungsgrad nicht besonders hoch. Das bedeutete, dass um für die geplanten Experimente eine genügende Quantität reines Enzyms zu erhalten, man von sehr grossen Mengen Rattenleber ausgehen musste, was nicht realisierbar war. Aus all diesen Gründen wäre dieses Verfahren nur im Falle einer fehlenden Alternative unausweichlich. Die Affinitätschromatographie im hier nachvollzogenen Verfahren ist nicht

einwandfrei. Durch Prüfen der Säuleneffluente beim Auftragen der Enzymprobe und des Waschpuffers, fand man, dass ca. 61% der Enzymaktivität auf diese Weise verloren gingen. Vielleicht ist das angewendete Affinitäts gel für die Enzymmenge nicht ausreichend effektiv, nicht stabil genug, oder die Beladung mit dem Liganden liegt unterhalb des angegebenen Wertes [169]. Es besteht noch die Möglichkeit, dass die im Affinitätsadsorbent bestehende Bindung N(5)-Sepharose ein für das Enzym wichtiges Element der Cofaktorstruktur überdeckt, und somit die Adsorption des Enzyms stört. Das nächste Problem stellt die Regenerierung des Gels dar. Das angewendete Gel ist bei den angegebenen Bedingungen nicht regenerierbar. Somit ergibt sich nur eine einmalige Benutzung des Gels. Diese Schwierigkeiten sind wahrscheinlich nicht unüberwindbar. Die Optimierung des Verfahrens bedarf jedoch wiederum intensiver Forschung, was nicht wenig Zeit und Arbeit bedeuten würde. Die hydrophobe Chromatographie stellte eine verblüffend schnelle und effektive Technik dar. Sowohl die Reinigung des Enzympräparats, als auch die nachfolgende Regenerierung des hydrophoben Materials war in mehreren Versuchen problemlos durchführbar. Als Abänderung hat man die schon erwähnte Konzentrierung mittels Sartorius-Ultrahülsen eingeführt. Um ausserdem den wahren Verlauf der Reinigung voll erfassen zu können, ist man zu einer anderen Assay-Auswertungsmethode übergegangen (siehe Beschreibung im Text). Das in Stufe II erstellte "aktivierte crude extract" zeigte nach halbjähriger Lagerung bei -80°C keine Aktivitätsverluste. Das reine Enzym verlor in dieser Zeit ca. 20% seiner Aktivität.

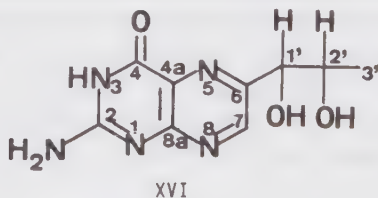
4. COFAKTOR STUDIEN

4.1 Theoretischer Teil

Ein breites Spektrum unkonjugierter, d.h. nicht mit dem p-Aminobenzoylglutamat- Rest verknüpfter, Pterine findet man in Mikroorganismen, Pflanzen, Insekten und Tieren. Einige natürliche Pterine besitzen eine Alkylseitenkette R-(meistens C₃) am C(6)-Atom des Pterinskeletts (XV)



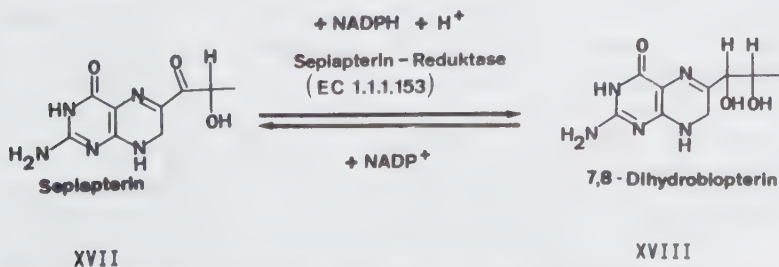
Die 6-Polyhydroxyalkylpterine sind von besonderem Interesse. Das L-Biopterin: 6-(1',2'-L-erythro-dihydroxypropyl)pterin (XVI)



(der Wachstumsfaktor von *Crithidia fasciculata*), wurde aus Bakterien, Amphibien, dem Futtersaft der Bienenkönigin und aus Menschenharn isoliert. Das 6,7,8,9-Tetrahydrobiopterin ist ein essentieller Cofaktor der biologischen Hydroxylierung. Ausser bei der Wirkung der Phenylalanin-4-Monooxygenase (EC 1.14.16.1), die das L-Tyrosin aus L-Phenylalanin herstellt, wird er die gleiche Rolle für die Tyrosin-3-Monooxygenase (EC 1.14.16.2) (L-Tyrosin zu DOPA) und für die Tryptophan-5-Monooxygenase (EC 1.14.16.4) (Tryptophan zu Serotonin) übernehmen. Somit spielt das Vorhandensein dieses Tetrahydropterin-Derivats eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese der Neurotransmitter Dopamin, Serotonin, Noradrenalin und Adrenalin. Diese sind für den Ablauf einiger Gehirnfunktionen verantwortlich 59,176 . Anscheinend gibt es noch viele weitere biologische Oxidations- bzw. Reduktions-Vorgänge, welche auf die unkonjugierten Pterine (Biopterin oder seine Analoga) als Cofaktoren angewiesen sind. Die Molybdän-haltigen Enzyme, wie z.B. Sulfat-Oxidase (EC 1.8.3.1), Xanthin-Dehydrogenase (EC 1.2.1.37) oder Aldehyd-Oxidase (EC 1.2.3.1) bedürfen ein Pterin-Derivat [212], um mit dem

Metall Molybdän einen Komplex (Molybdän-Cofaktor) zu bilden [213]. Ferner gibt es noch Anhaltspunkte für die Annahme, dass Tetrahydrobiopterin und seine Analoga eine wichtige Rolle im zellulären Elektronentransport spielen und zwar in den Chloroplasten und vor allem in den Mitochondrien. Hydrierte Pterine stimulieren die mitochondriale Atmung [177,178].

Die Wirkung des 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterins in der enzymatischen Hydroxylierung des L-Phenylalanins wurde schon genauer beschrieben (Kapitel 1.2.1). Seit der Isolierung dieses Cofaktors aus Rattenleber [39] und seiner Identifizierung als Biopterin-Derivat [40], wurden schon mehrere Arbeiten durchgeführt um die für das Enzym bestwirkende und somit dem natürlichen Cofaktor nächststehende Struktur des Pterincofaktors herauszufinden. Die Fortschritte der Synthese solcher Verbindungen, die besonders seit 1968, d.h. seit der Veröffentlichung der Synthese von reinen 7-isomerenfreien, 6(Trihydroxypropyl)-pterinen durch Viscontini et al. [179,180], sehr intensiv betrieben wurden, haben die Möglichkeit einer direkten Ueberprüfung der Wirkung dieser Derivate im Enzymsystem ermöglicht. Es ist jedoch auch auf diesem Gebiet eine ganze Anzahl von Ungereimtheiten und Widersprüchen zu verzeichnen. Schon die in der Tabelle III zusammengestellten Daten drücken diese Probleme aus, da für eine Substanz die Unterschiede der gemessenen K_m -Werte den Faktor 100 überschreiten. Es ist jedoch durch die differenzierten Messmethoden und die verschiedenen reinen Enzympräparate erklärbar. Es gibt aber noch Differenzen, deren Ursache nur schwer nachweisbar ist. So publizierte z.B. Kaufman 1959 [23] die Ergebnisse eines Assays in dem Sepiapterin (XVII) ($K_m = 4 \times 10^{-6}M$) und Isosepiapterin (1/3 Sepiapterin-Aktivität) sich eindeutig als Phenylalanin-4-Monooxygenase Cofaktoren bestätigten. Diese Resultate wurden von Matsubara et al. [181] widerlegt. Dieser Autor konnte nämlich beweisen, dass erst nach Einwirkung der Sepiapterin-Reduktase (EC 1.1.1.153), die Sepiapterin in Dihydrobiopterin (XVIII) umwandelt, eine Cofaktoraktivität für das Sepiapterin gemessen werden kann.



Aus diesen Gründen schien es eindeutig, dass nur die Vergleichsassays, also die Assays, die für eine Reihe der verschiedenen Cofaktoren mit allen an-

deren gleichbleibenden Reaktionsteilnehmern durchgeführt werden, aussagekräftig wären. Ausserdem ist es sehr wichtig, dass möglichst keine Proteine ausser dem Enzympräparat eingesetzt werden, und wenn das nicht realisierbar ist, dann sollen die "fremden Proteine" kristallin sein.

Einiges über die in Frage kommenden Strukturvarianten des Cofaktors konnte schon festgestellt werden.

Bei der Methylierung des C(2)-Amins z.B. sinkt die Aktivität auf 1/3 der Ursprungsaktivität. Die Dimethylierung dieses Amins oder die Substitution des N(8) mit einer Hydroxyethylgruppe führt zum vollständigen Aktivitätsverlust [46].

Es wurden verschiedene Verbindungen auf ihre Cofaktorwirkung geprüft [182]. Dazu gehören die folgenden 5,6,7,8-Tetrahydro-Derivate (TH) des Pterins

R = H TH-Pterin: 25% Aktivität [183]

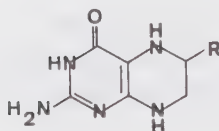
oder: 13% Aktivität [9]

R = CH₃ 6-Methyl-TH-Pterin: 100% Aktivität [183]

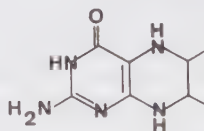
R = Ø 6-Phenyl-TH-Pterin: 25% Aktivität [183]

R = 1',2'-L-erythro-Dihydroxypropyl

TH-Biopterin: 100% Aktivität [9,183,184]



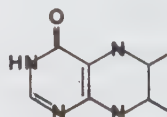
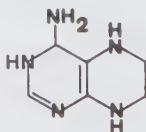
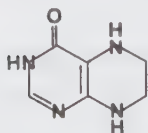
sowie:



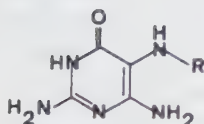
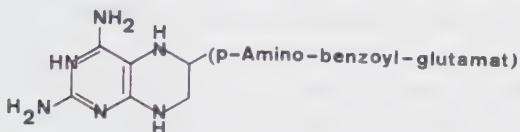
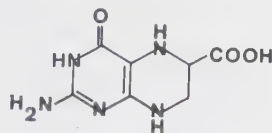
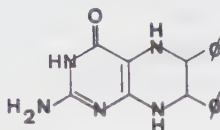
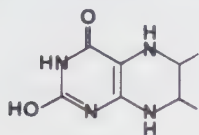
XIX

6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin: 22% Aktivität [9]; 8% Aktivität [184], aber auch 100% Aktivität [185].

Das 7-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin zeigte ungefähr die gleiche Aktivität wie das 6,7-Dimethyl-derivat, gleichzeitig wurden pro 1 mol L-Tyrosin (ohne Regenerierung) jeweils 2 mol dieses Derivats und auch des 5,6,7,8-Tetrahydropterins [9] gebraucht [186]. Als nicht aktiv hat man folgende Verbindungen festgestellt [9]:



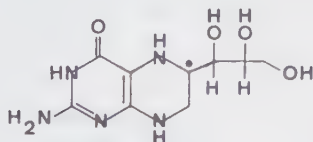
Kleine Restaktivität konnte für folgende Verbindungen gemessen werden:



R = H; 2,5,6-Triaminopyrimidin-4-on 1% Aktivität
[183]

R = CH₂-Ø; 5-Benzylamin-2,6-diamino-pyrimidin-4-on
0,2% Aktivität

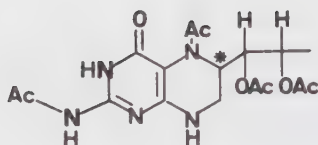
Auch das Tetrahydro-D-neopterin (XX) mit dem 6-(1',2',3'-D-erythro-Trihydroxypropyl) Substituent



XX

zeigte eine hohe Cofaktoraktivität [46]. Für die bakterielle Phenylalanin-4-Monooxygenase, die aus Pseudomonas sp isoliert wurde, konnte man ebenfalls das reduzierte Pterinderivat als Cofaktor feststellen. Diesmal wurde aber das Tetrahydro-D-neopterin (XX) bevorzugt [177].

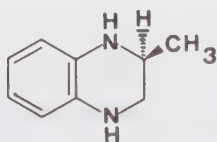
1977 wurde die erste brauchbare regiospezifische Synthese des L-Biopterins (XVI) [186a] durchgeführt und anschliessend wurde das Diastereomergemisch von 6(R,S)- 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (XXIII) durch Furrer et al. [187] zu den beiden (6R)-(XXIV) und (6S)-(XXV) Diastereomeren in der fraktionierten Kristallisation ihrer (6R,S)-N(2),5-Diacetyl-1',2'-di-O-acetyl Derivate (XXI) aus MeOH, gefolgt durch die Hydrolyse mit HCl, getrennt. Die Verbindung XXIV entsprach dem "natürlichen" Tetrahydrobiopterin.



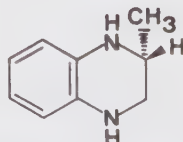
XXI

Fast gleichzeitig haben zwei andere Gruppen danach auch die Trennung der 6-Diastereomeren Tetrahydrobiopterine (XXIII) auf anderem Wege erreicht. Bailey et al. [188] gelang diese Trennung mittels HPLC mit einem starken Kationenaustauscher. CD-Spektren (bei pH 1,0 und 7,4) zeigten spiegelbildlich-symmetrische Kurven für die beiden Diastereomeren. Die Iod-Oxidation und nachfolgende enzymatische Reduktion mit Tetrahydrofolat-Reduktase (EC 1.5.1.3) ergab nur eine Verbindung, das "natürliche" Tetrahydrobiopterin. Die K_m -Werte für beide Diastereomere waren fast gleich, die Aktivität der Phenylalanin-4-Monooxygenase war ca. 4 mal höher für das "natürliche" Diastereomer.

Japanische Forscher [189,190] haben gemäss [188] die absolute Konfiguration am C(6) des Tetrahydrobiopterins bestimmt. Zu diesem Zweck haben sie stereospezifisch und enzymatisch das 6-Methyl-tetrahydropterin und das Tetrahydrobiopterin aus ihren 7,8-Dihydroderivaten hergestellt. Das (2S)- und (2R)-1,2,3,4-Tetrahydro-2-methyl-chinoxalin wurden als Modellverbindungen synthetisiert.

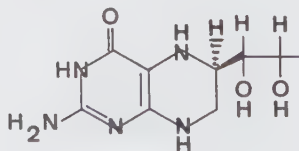


2(S)-Chinoxalinderivat



2(R)-Chinoxalinderivat

Der Vergleich der entsprechenden CD-Spektren ermöglichte es, dem natürlichen Tetrahydro-L-biopterin die (6R)-Konfiguration zuzuschreiben.



XXII

4.2 Experimenteller Teil

Die folgenden Verbindungen wurden auf ihre Cofaktorwirkung bei der Hydroxylierung untersucht (K_m und V_{max}):

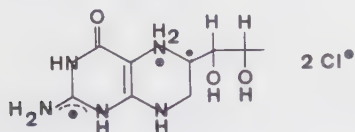
5,6(RS)-7,8-Tetrahydro-L-biopterin-2 HCl (XXIII)

M_r : 314,17

($\epsilon_{267} = 16 \times 10^{-3} \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

UV-VIS: Max. 217 nm, 219 nm, 267 nm

Min. 218 nm, 242 nm

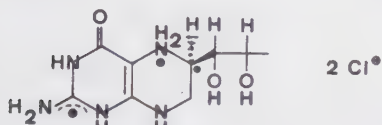


XXIII

5,6(R)-7,8-Tetrahydro-L-biopterin-2 HCl (XXIV)

M_r : 314,17

UV-VIS: Max. 219-220 nm

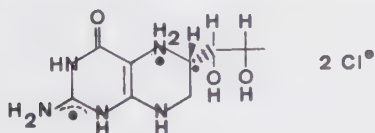


XXIV

5,6(S)-7,8-Tetrahydro-L-biopterin-2 HCl (XXV)

M_r : 314,17

UV-VIS: wie XXIV



XXV

Racemat von (6S,7R)- und

(6R,7S)-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-2 HCl (XXVI)

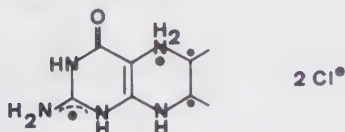
M_r : 268,15

($\epsilon_{266} = 17,8 \times 10^{-3} \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

UV-VIS: Max. 213 nm, 218-223 nm

266 nm

Min. 217^a nm, 242 nm



XXVI

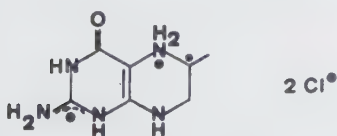
6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-2 HCl (XXVII)

M_r : 254,15

($\epsilon_{266} = 17,8 \times 10^{-3} \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

UV-VIS: Max. 210 nm, 266 nm

Min. 242 nm



XXVII

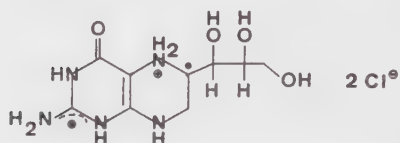
5,6(RS)-7,8-Tetrahydro-D-neopterin-2 HCl (XXVIII)

M_r : 330,17

($\epsilon_{267} = 16 \times 10^{-3} \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

UV-VIS: Max. 220 nm, 267 nm

Min. 243 nm



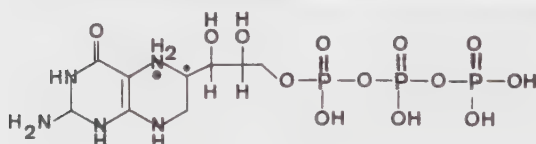
XXVIII

5,6(RS)-7,8-Tetrahydro-D-neopterin-triphosphat-2 HCl (XXIX)

M_r : 570,17

UV-VIS: Max. 216 nm, 218-220 nm

Min. 217 nm, 243 nm



XXIX

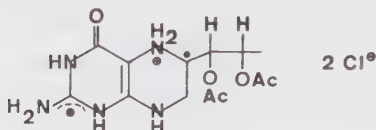
Diacetyl-5,6(RS)-7,8-tetrahydro-L-biopterin-2 HCl (XXX)

M_r : 398,17

($\epsilon_{267} = 16 \times 10^{-3} \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

UV-VIS: Max. 210 nm, 267 nm

Min. 242 nm



XXX

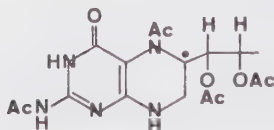
Tetraacetyl-5,6(RS)-7,8-tetrahydro-L-biopterin (XXI)

M_r : 409,19

UV-VIS: Max. 224-241 nm

270-297 nm

Min. 255 nm



XXI

7,8-Dihydro-L-biopterin-2 H₂O (XVIII)

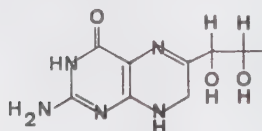
M_r : 291,27

($\epsilon_{278} = 7,0 \times 10^{-3} \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

UV-VIS: Max. 221-240 nm, 278 nm

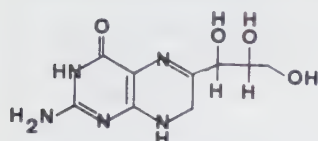
328 nm

Min. 254 nm, 296 nm



XVIII

7,8-Dihydro-D-neopterin-2 H₂O (XXXI)



XXXI

M_r : 291,27

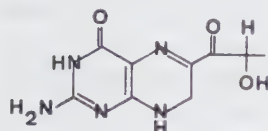
($\epsilon_{330} = 6,2 \times 10^{-3} \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

UV-VIS: Max. 224-240 nm, 280 nm

330 nm

Min. 254 nm, 298 nm

Sepiapterin-2 H₂O (XVII)



XVII

M_r : 273,25

($\epsilon_{267} = 16,1 \times 10^{-3} \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

UV-VIS: Max. 227 nm, 268 nm

ab 313 nm steigend

Min. 218 nm, 240 nm

312 nm

4.2.1 Herstellung und Kontrolle der Lösungen

Die untersuchten Pterin-Derivate wurden in Prof. Viscontinis Labor hergestellt und gereinigt. Das zur Herstellung der Lösungen benötigte bidestillierte Wasser wurde unter perlendem Stickstoff während 15 Minuten ausgekocht und dann abgekühlt. Die zu untersuchenden Pterinderivate wurden jeweils im Dunkeln unter einem Stickstoffzelt in ein tariertes und mit N₂ ausgespültes Glasgefäß abgefüllt und sehr gut verschlossen. Die benötigte Menge des Lösungsmittels, wurde unter dem Stickstoffzelt hinzugefügt. Nach dem Auflösen der Substanz wird die Lösung durch einen Millipore-Filter gereinigt und sofort fest verschlossen. (Antibiotikumviolen mit Gummikapsel wurden hierfür verwendet). Die jeweilige Pterinderivatlösung wurde zusammen mit den Standardlösungen einer HVE (high voltage electrophoresis) unterworfen, um die Identität des Derivates zu bestätigen und etwaige Zersetzungsprodukte zu erfassen. Die untersuchte Probe wurde immer in drei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Die Bedingungen wurden wie folgt ausgewählt:

CAMAG HVE, HE 5000 Gerät (MuttENZ, Schweiz)

Spannung: 4000 Volt (bei 50 - 100 mA Strom)

Mobile Phase: 0,7M HCOOH; 2,1M CH₃COOH; Wasser 26 : 124 : 850

pH ca. 2,0

Laufzeit: 15 - 20 Minuten

Papier: Schleicher and Schüll No. 2043 B

Das Papier wurde vor dem Auftragen der Substanzen mit 0,1%-iger (G/V) Ascorbinsäure-Lösung getränkt. Die frisch vorbereiteten Lösungen wurden im

Dunkeln aufgetragen. Danach führt man die Elektrophorese bei den oben angegebenen Bedingungen durch. Als einzige Ausnahme wurde die HVE-Prozedur für das Tetrahydroneopterin-triphosphat mit 0,03M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 als mobile Phase vollzogen, die Laufzeit wurde auf 10 Minuten gekürzt. Nach dem Trocknen während 5 Minuten bei 100°C wurden die Elektrophorogramme unter UV-Licht bei der Wellenlänge $\lambda = 350 \text{ nm}$ betrachtet und die entsprechenden Flecken identifiziert.

Diese Untersuchung ermöglichte den Nachweis vorhandener Oxidationsprodukte sowie die eventuelle Abschätzung der Verhältnisse zwischen verschiedenen Oxidationsstufen der Pterinderivate. Die Standardlösung enthielt folgende Pterine: L-Sepiapterin, Xanthopterin, Dihydroxanthopterin, 6,7-Dimethylpterin, 6,7-Dimethyltetrahydropterin, Dihydro-L-biopterin, L-Biopterin, Tetrahydro-L-biopterin, Tetrahydro-D-neopterin, 6-Methylpterin, Pterin, Dihydro-D-neopterin und D-Neopterin.

Von den frisch vorbereiteten Pterinderivatlösungen wurden jeweils sofort die UV- VIS Spektren bei $\lambda = 210 - 350 \text{ nm}$, Scan: 1 nm/s, aufgenommen. Gerät: UNICAM SP - 1700, SP 1805 Programme Controller, AR - 25 Linear Recorder. Anhand der vorhandenen Literaturangaben [191] bezüglich den molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) hat man die effektiven Konzentrationen der Lösungen ermittelt ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$).

4.2.2 Bestimmung der Cofaktor-Aktivität

Für jedes Pterinderivat wurde eine Verdünnungsreihe vorbereitet. Die Proben wurden immer doppelt (für jede Konzentration) und jeweils mit einem eigenen Leerwert (ohne L-Phenylalanin und zunächst Deproteinisierungsmittel, dann die Enzymlösung) eingesetzt. Da diese Experimente sofort nach Herstellung der Lösungen und ihrer Kontrolle durchgeführt worden sind, war es nicht möglich, alle zu untersuchenden Cofaktoren im gleichen Ansatz zu bestimmen. Um eventuelle Differenzen der Enzymaktivität, sowie der angewendeten Assaykomponenten zu kompensieren, hat man für jede Serie der Proben eine Kontrolle mitgeführt, die 0,658mM Lösung des racemischen 6,7-Dimethyltetrahydropterins als Cofaktor enthielt. Letztere wurde anhand ihrer Stabilität ausgewählt - die Lösung in 0,005N HCL, wie oben beschrieben vorbereitet und kontrolliert, wurde portionenweise tiefgefroren (Aceton/Trockeneis) und bei -20°C aufbewahrt. Nach 3 Monaten wurden keine Unterschiede, weder im UV-VIS Spektrum noch im HVE-Elektrophorogramm festgestellt.

Die Zusammensetzung der Proben entsprach dem "Enzym assay" (siehe Kapitel 2.2.1, S.37) und zwar wie folgt:

0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,6

1,0mM L-Phenylalanin

0,1 ml Enzymlösung

3 Minuten Aktivierung bei 37°C

290 E Katalase

6mM Dithiothreitol

0,01 - 6mM Cofaktor-Lösung

30 Minuten Inkubation bei 37°C

Die Leerwertproben (ohne L-Phenylalanin) bedurften weder der Aktivierung noch der Inkubation. Ausserdem wurde in diese Proben zuerst das Deproteinierungsmittel (0,2 ml 30%-ige $\text{CCl}_3\text{-COOH}$ Lösung) und erst dann die Enzymlösung einpipettiert. Das Auswerten der Proben erfolgte nach der im Kapitel 2.2.3.1 beschriebenen Methode (1-Nitroso-2-naphthol) und wurde jeweils zusätzlich mit der GC-Methode überprüft (Kapitel 2.2.3.4).

Ermitteln der $v_{\max}$ und der Apparent K_m -Werte

Aus den jeweiligen Verdünnungsreihen, nach der Korrelation mit der Kontrollprobe, wurde eine graphische Darstellung nach Michaelis-Menton angefertigt

$$v = f(S) \quad \text{wobei } v = \text{Enzymaktivität}$$

$$S = \text{Substanzkonzentration ist.}$$

Anschliessend wurde auch die Lineweaver-Burk Gleichung:

$$\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{S}\right) \quad \text{graphisch dargestellt.}$$

Aus den beiden Darstellungen konnte man die $v_{\max}$ (maximale Enzymaktivität) und die K_m (Michaelis-Konstante)-Werte entsprechend extrapolieren, wie das in der Abbildung 39 und Tabelle XII gezeigt wird.

Abb.39 Graphische Darstellung der Enzymaktivität für 5,6(RS)-,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (XXIII) als Cofaktor (Beispiel).

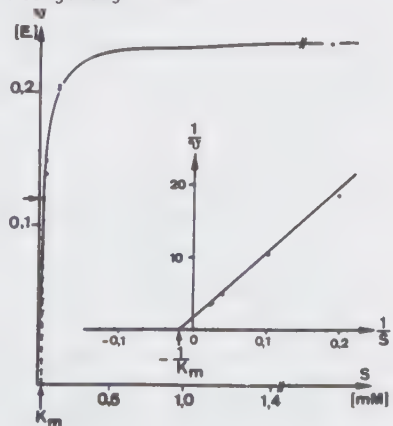


Tabelle XII Enzymaktivität als Funktion der Konzentration von
5,6(RS),7,8-Tetrahydro-L-biopterin (XXIII) (Beispiel)

	µl 8,9mM Lsg. in 1 ml Probe	Konzentr. S [µM]	$\frac{1}{S}$	E ₄₅₀ korr.	v [E.]	$\frac{1}{v}$
1	10	8,9	0,112	0,191/0,216	0,058/0,066	17,2/15,2
2	20	18,0	0,056	0,296/0,313	0,090/0,095	11,1/10,5
3	50	44,5	0,022	0,542/0,524	0,166/0,162	6,02/6,17
4	80	71,0	0,014	0,551/0,578	0,170/0,176	5,88/5,68
5	100	89,0	0,011	0,597/0,601	0,182/0,184	5,49/5,43
6	150	133,5	0,007	0,621/0,635	0,202/0,204	4,95/4,90

Apparent $K_m = 2,74 \times 10^{-5}M$
 $v_{max} = 0,238 \text{ E.}$

4.2.3 Resultate

Die Resultate der einzelnen Pterinderivate werden in Tabelle XIII gezeigt.

Zusätzlich wurde noch ein Test durchgeführt, wodurch die Bestätigung für die gleichwirkende chemische wie auch enzymatische Reduktion gesucht wurde. Es handelte sich dabei um die dihydrierten Pterinderivate, d.h., das 7,8-Dihydro-D-neopterin (XXXI), 7,8-Dihydro-L-biopterin (XVIII) und L-Sepia-pterin (XVII), die in dieser Form für das Enzym keine Aktivität als Cofaktor zeigen und mit Dithiothreitol im "Enzym assay" auch inaktiv geblieben sind. Hierzu hat man den "Enzym assay" nach Angaben von Craine et al. [192] wie folgt modifiziert:

1mM L-Phenylalanin
 0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,6
0,1 ml Enzymlösung
 3 Min. bei 37°C aktiviert
 290 E. Katalase
 1 E. Dihydropteridin-Reduktase (EC 1.6.99.7)
2,7mM β-NADH
 30 Min. bei 37°C inkubiert

Auch in diesem enzymatisch sich-selbst-regenerierenden Assay konnte keine Cofaktorwirkung der erwähnten Dihydropterinderivate festgestellt werden. Somit wurde nochmals bestätigt, dass sowohl das Dithiothreitol wie auch die Dihydropteridin-Reduktase keine 7,8-Dihydropterine als Substrate akzeptieren. Es bleibt also das chinoide Dihydropterinderivat als für die beiden Systeme akzeptable Species.

1 Einheit der Enzymaktivität (1 E.) wurde als die Menge des Enzyms definiert, die zur Entstehung 1 μ mol L-Tyrosin bei den Reaktionsbedingungen benötigt wird.

Tabelle XIII Kinetische Daten von Cofaktoren für die Phenylalanin-4-Mono-oxygenase Reaktion

Cofaktor	Apparent K_m [M]	$v_{max.}$ [E.]	$v_{rel.}$ [%]
5,6(R),7,8-TH-L-Biopterin (XXIV)	$4,35 \times 10^{-5}$	0,526	100,0
5,6(RS);7,8-TH-L-Biopterin* (XXIII)	$2,74 \times 10^{-5}$	0,238	45,2
5,6(S),7,8-TH-L-Biopterin (XXV)	$1,25 \times 10^{-4}$	0,09	17,1
6(RS), (7RS)Me ₂ -THPterin**	$8,85 \times 10^{-5}$	0,145	27,6
6(RS)Me-THPterin**(XXVII)	$5,95 \times 10^{-5}$	0,508	96,6
5,6(RS),7,8-TH-D-Neopterin* (XXVIII)	$1,38 \times 10^{-4}$	0,244	46,4
5,6(RS),7,8-TH-D-Neopterin.P ₃ * (XXIX)	a k t i v		
Diacetyl-TH-L-Biopterin* (XXX)	s c h w a c h a k t i v		
Tetraacetyl-TH-L-Biopterin* (XXI)	i n a k t i v		
7,8-DH-L-Biopterin(XVIII)	i n a k t i v		
7,8-DH-D-Neopterin(XXXI)	i n a k t i v		
L-Sepiapterin(XVII)	i n a k t i v		

* Diastereomerengemisch

**Racemat

4.3 Diskussion und Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurde die Suche nach dem idealen Cofaktor für die Phenylalanin-4-Monooxygenase fortgesetzt. Dabei schränkte man die untersuchten Substanzen auf diejenigen mit intaktem Pteringerüst ein.

Es hat sich dabei herausgestellt, dass aus allen untersuchten Verbindungen das 5,6(R)-7,8-Tetrahydro-L-biopterin (XXIV) eindeutig bevorzugt ist (100% Aktivität gegenüber 17,1% für das 6(S)-Diastereomer (XXV)), was mit den Literaturangaben übereinstimmt [188] .

Auf Grund der Untersuchungen mit den acetylierten Derivaten konnte man nochmals die Wichtigkeit des Bestehens von N(5) und NH₂-C(2) als intakte unsubstituierte Zentren bestätigen. Das in der Seitenkette diacetylierte Derivat (XXX) blieb immer noch, wenn auch nur schwach, aktiv, wogegen das N(2),N(5),1',2'-tetraacetylierte Tetrahydro-L-biopterin (XXV) sich als komplett inaktiv erwies.

Wie erwartet, zeigten die 7,8-dihydrierten Derivate gar keine Cofaktorwirkung. Es konnte jedoch noch keine eindeutige Aussage im Bezug auf die Identität des wahren, "natürlichen" Cofaktors gemacht werden. Das 6(RS)-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XXVII) hat fast die gleiche Aktivität wie das aktivere 6(R)-Diastereomer (XXIV) des Tetrahydro-L-biopterins (96,6%); es ist jedoch als racemisches Gemisch eingesetzt worden. Vielleicht könnte die Trennung der beiden Enantiomere einen noch aktiveren Cofaktor für die Phenylalanin-4-Monooxygenase liefern. Auch die tiefere Aktivität, die für das 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-Racemat (XXVI) gemessen wurde (27,6%) kann noch nicht interpretiert werden, weil der komplexere (aus zwei Enantiomeren bestehend) Gemischcharakter berücksichtigt werden muss. Auch in diesem Fall könnte erst nach Untersuchung der beiden Enantiomeren eine begründete Aussage diesbezüglich gemacht werden. Auch die Bevorzugung der verschiedenen Alkylseitenketten müsste erst durch die Untersuchung der entsprechenden Derivate ermittelt werden.

Zur Zeit kann man höchstens behaupten, dass die Methylierung des C(6) und C(7) die Wirkung des Pterincofaktors nicht aufhebt.

Die komplizierte Wirkung des Triphosphats von Tetrahydro-D-neopterin kann mit der nötigen Abspaltung der Phosphatreste begründet werden, für welche im "Enzym assay" wahrscheinlich nicht die optimalsten Bedingungen vorlagen.

5. KLINISCHE DIAGNOSTISCHE ANWENDUNG DER ANALYTISCHEN METHODEN

5.1 Theoretischer Teil

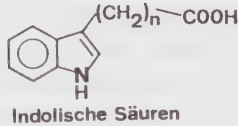
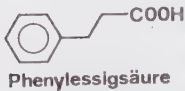
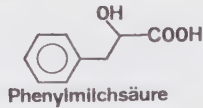
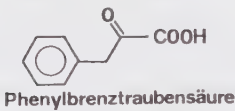
Die Störungen, die im Bereich des Phenylalanin-Stoffwechsels liegen, sind als Phenylketonurie (PKU), Hyperphenylalaninaemie (HPA) und Pterin-Mangel beschrieben worden. Die längst bekannte und verhältnismässig oft vorkommende Phenylketonurie wurde schon 1934 beschrieben (Fölling). Als synonyme Bezeichnungen werden noch Föllingsche Krankheit, Brenztraubensäure-Schwachsinn, Morbus Fölling, Oligophrenia phenylpyruvica oder Imbecillitas phenylpyruvica gebraucht [193]. Es handelt sich dabei um eine genetisch bedingte Erkrankung, die eine geistige Retardierung mit mehr oder minder ausgeprägtem Schwachsinn zur Folge hat. Für das klinische Krankheitsbild werden noch folgende Symptome angegeben: Aggressivität, EEG (Elektroencephalogramm)-Abnormitäten, vermehrte Muskelspannung, Microcephalie, Hyperkinese und Semi-albinismus (da das Pigment Melanin auch ein Abbau-Produkt des L-Tyrosins darstellt). Durch die Verabreichung einer phenylalaninarmen Diät kann man die Verdunkelung der Haare, die Normalisierung des IQ und des EEG beobachten. Bei unbehandelten PKU-Kindern mit den Anzeichen der mentalen Retardierung ist nach dem beendeten dritten Lebensjahr jegliche Behandlung sinnlos [194,195].

Das diagnostische Kennzeichen dieser Krankheit war zuerst die überhöhte Ausscheidung der Phenylbrenztraubensäure im Harn. Die PKU wurde mit der Häufigkeit von ca. 1 auf 10'000 untersuchte Fälle diagnostiziert. Die heterozygoten Defekträger sind phänotypisch gesund und unterscheiden sich in ihren IQ-Werten nicht von der übrigen Population. Heute wird bei allen Neugeborenen während ihrer ersten Lebenswoche ein "Guthrie Inhibition Assay Test" als "screening" durchgeführt [193]. Diesem Test liegt die Eigenschaft des Phenylalanins, die hemmende Wirkung des 2-Thienylalanins auf das Wachstum von Bacillus subtilis aufzuheben, zugrunde. Für die somit entdeckten Fälle sind folgende biochemische Befunde typisch [195].

Tabelle XVI Vergleich der biochemischen Befunde für PKU-Patienten und Kontrollpersonen

Aminosäure	Harn [mg/24 Std.]		Blutplasma [mg/100 ml]	
	normal	PKU	normal	PKU
Phenylalanin	10 - 30	200-400	0,84	15-60
Tyrosin	15 - 50	0	1,03	0

Ausserdem findet man im Urin die "abnormalen", durch die Transaminierung entstehenden Phenylalanin-Metaboliten [196-198], wie:



in der Gesamtmenge von 500 - 2000 mg/24 Std. Urin.

Sie entstehen dadurch, dass der Hauptabbauweg nicht funktioniert und infolgedessen eine Anhäufung dieser Aminosäuren stattfindet, wodurch auch der sekundäre Metabolismusweg beschritten wird.

Eine möglichst frühzeitige Diagnose vor der mentalen Retardierung, d.h. bis ca. zum sechsten Lebensmonat, ist sehr wichtig, denn mit der phenylalanin-armen Diät können die Folgen behoben werden. Dies ist wissenschaftlich erwiesen [194].

Bei Phenylketonurie-Patienten ist es die mangelhafte Wirksamkeit der Phenylalanin-4-Monooxygenase, die als Erkrankungsursache diagnostiziert wurde [199]; der Cofaktor wurde in Leberbiopsien als normal gemessen [200]. Das Enzym kann z.B. durch eine Genmutation verändert sein. Eine differenzierte Diagnose, die zwischen einem typischen PKU-Fall, der mit dem totalen Fehlen (oder Defekt) der Phenylalanin-4-Monooxygenase zusammenhängt und

einem Hyperphenylalaninaemie (HPA)-Fall, bei dem noch ein Rest an Aktivität dieses Enzyms vorhanden ist [201,202], zu unterscheiden vermag, ist von grosser Wichtigkeit. Die HPA- Erkrankten brauchen keine Diät, weil sie höhere Phenylalanin-Mengen als die PKU- Kranken ertragen können, da bei ihnen eher ein Defizit als ein Defekt des Enzyms vermutet wird. Die Funktionsfähigkeit des Enzymsystems ist unter anderem auch von der Zugänglichkeit des Cofaktors (Tetrahydro-L-biopterin) abhängig, welcher entweder durch die "de novo" Synthese oder durch die Regenerierung im enzymatischen Zyklus hergestellt wird. Die eventuellen Störungen, die mit dem Mangel an Pterin-Cofaktor zusammenhängen, sind entschieden schwerwiegender in den Folgen, was auch verständlich wird, wenn man die Vielfalt der metabolischen Stufen, die durch diesen Cofaktor beeinflusst werden, bedenkt (siehe Kapitel 4.1.) [203].

Seit 1975 ist eine neue Variante der Phenylketonurie bekannt. Trotz guter diätetischer Kontrolle zeigten die Patienten schwere cerebrale Mängel und starben, falls nicht behandelt, zwischen dem zweiten und dem siebten Lebensjahr. Diese Krankheit wurde mit dem Terminus "Maligne Hyperphenylalaninaemie" bezeichnet. Die Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten werden intensiv erforscht [204,205,214].

5.2 Experimenteller Teil

5.2.1 Indirekte "in vivo" Enzymaktivitäts - Bestimmung

Um eine differenzierte Diagnose für die Fehlfunktion des Enzymsystems der Phenylalanin-4-Monooxygenase zu ermöglichen, wurde eine Methode ausgearbeitet, um eine indirekte "in vivo" Bestimmung der Enzymaktivität beim Menschen durchführen zu können. Versuche in dieser Richtung wurden bereits vorher unternommen, jedoch war die Zuverlässigkeit der Methoden, sowie ihre Spezifität zu gering [206].

5.2.1.1 Belastung mit L-Phenylalanin-d₅ "per os"

Nach dem Fasten während der Nacht wurde den zu untersuchenden Personen eine Blutprobe entnommen, die als Nullwert-Probe betrachtet worden ist. Danach wurde diesen Personen jeweils 200 mg L-Phenylalanin-d₅ pro Kilogramm Körpergewicht in Apfelmus verabreicht [207]. Es folgte je eine Blutentnahme 1 Stunde, 2 Stunden und 4 Stunden nach der Belastung.

5.2.1.2 . Proben-Vorbereitung

Die heparinisierten Blutproben wurden 30 Minuten bei 2'000 x g zentrifugiert und die somit gewonnenen Plasmaproben verwendete man zur Bestimmung des L-Phenylalanins und des L-Tyrosins. Pro Bestimmung waren 0,5 ml Plasma ausreichend. Man setzte jeder Probe 5 µg 4-[²H]-L-Phenylalanin und 10 µg [²H]-L-Tyrosin als interne Standards zu. Diese Mengen entsprechen den normalen Werten im Plasma. Nach Zugabe von 0,5 ml wässriger 4%-iger (G/V) 5-Sufosalicylsäure- Lösung als Deproteinisierungsmittel hat man die Proben zweimal jeweils 20 Minuten lang bei 2'000 x g zentrifugiert und den Ueberstand auf eine Ionenaustauschsäule aufgetragen. Die Säulen enthielten ca. 1ml Dowex 50 W x 8 Kationenaustauscher in der H⁺-Form und wurden vor dem Gebrauch wie folgt regeneriert: H₂O/1N NaOH/H₂O/1N HCl/H₂O. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit 100 ml dest.Wasser gewaschen und anschliessend die Aminosäuren mit 1N NH₄OH- Lösung eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt und bei λ = 240 nm gegen Wasser spektrophotometrisch gemessen. Die UV-absorbierenden Fraktionen wurden vereinigt und mit dem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft. Wasserspuren wurden durch wiederholtes Eindampfen mit kleinen Mengen Dichlormethan azeotrop entfernt.

5.2.1.3 Derivatisierung der Proben

Es folgte die Synthese der N,O-Trifluoracetyl,methylester Derivate. Nach Zugabe von 200 µl Acetonitril und 200 µl Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) wurden die Proben 10 Minuten stehen gelassen. Nach dem Abblasen mit Stickstoff wurden die Proben mit einer Diazomethanolösung versetzt [208] und nach abermaligem Abblasen in 40 µl TFAA und 200 µl Acetonitril aufgenommen.

5.2.1.4 GC-MS Analyse mit der SIM-Methode

Die Bedingungen wurden wie schon beschrieben gewählt (siehe Kap. 2.2.3.5). Zu jeder Serie der Proben führte man mindestens drei verschiedene Punkte der erstellten Eichkurve parallel mit, was als zusätzliche Kontrolle für die Übereinstimmung der Methode diente.

Zur Bestimmung der Aminosäuren hat man folgende Ionen gemessen:

für Phenylalanin

m/z 162	"natürliches" Phe
" 166	Belastungsmaterial
" 167	"
" 163	interner Standard

für Tyrosin

m/z 274	"natürliches" Tyr
" 277	Belastungsmaterial
" 278	"
" 280	interner Standard

Ein typisches SIM-Chromatogramm 2 Stunden nach Belastung sah wie folgt aus:

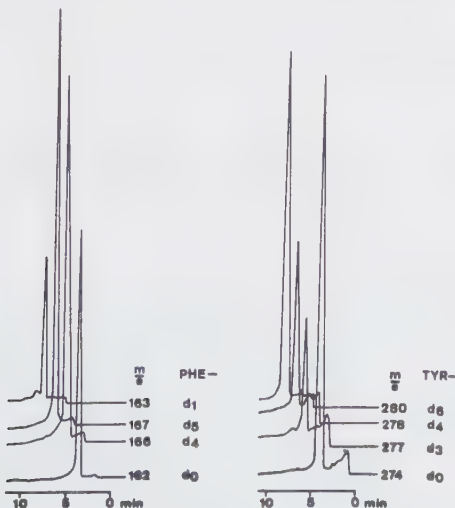


Abb.40 GC-SIM-Chromatogramm für die "in vivo" Enzymaktivitäts-Bestimmung

Die aus dem SIM-Chromatogramm direkt gemessenen Werte für Phenylalanin- d_0 und Phenylalanin- d_1 mussten noch korrigiert werden, da das Ion m/z 162 des undeuterten Phenylalanins einen Isotopenanteil von 12% (d.h. Masse m/z 162) besass und das deuterierte Phenylalanin- d_1 10% für das m/z 162 - 1 Ion zeigte. Diese Korrektur wurde jeweils, gemäss der Gleichung, mathematisch durchgeführt:

$$100\% D_0 = 1,012d_0 - 0,121d_1$$

$$100\% D_1 = 1,012d_1 - 0,101d_0$$

wobei: d_0, d_1 -Messwerte für Phe- d_0 , bzw. Phe- d_1 ;

D_0, D_1 -korrigierte Werte bedeuten. (Details siehe S.68)

Die ausgerechneten Anteile an d_0 -, d_4 - und d_5 -Phenylalanin und diejenigen für d_0 -, d_3 und d_4 -Tyrosin wurden jeweils durch den Abzug der entsprechenden Leerwerte (aus der Probe vor der Belastung) berichtigt. Da aus technischen Gründen (nur je vier Massenfokussierungen pro Aminosäure möglich) nur zwei Deuterierungsvarianten messbar waren, musste man noch einen Koeffizienten berücksichtigen, um die gesamte Isotopenverteilung zu erfassen. Man nimmt dabei die Summen

1. aller deuterierten Moleküle: $\sum d_1 \dots d_n$

2. der gemessenen deuterierten Moleküle: $\sum d_a, d_b$

wobei a, b im Fall von Phenylalanin gleich 4, 5; im Fall von Tyrosin gleich 3, 4 sind

3. der Molekulargewichte: $M \sum d_1 \dots d_n$

4. der Molekulargewichte: $M \sum d_a, d_b$

aus (1), (2), (3) und (4) ergibt sich:

$$\sum d_1 \dots d_n = \frac{\sum d_a, d_b \times M \sum d_1 \dots d_n}{M \sum d_a, d_b} \dots (5)$$

somit für

$$\text{Gesamt deut.-Phe} = \frac{155,2 \times \sum d_4\text{-Phe}, d_5\text{-Phe}}{140,8} \dots (6)$$

$$\text{also Gesamt deut.-Phe} = 1,10 \sum d_4\text{-Phe}, d_5\text{-Phe} \dots (7)$$

und per analogiam:

$$\text{Gesamt deut.-Tyr} = 1,14 \sum d_3\text{-Tyr}, d_4\text{-Tyr}$$

Die Werte wurden noch mit den Eichkurven-Angaben abgestimmt, die jeweils einen Faktor ergeben, der die Umrechnung auf mg/100 ml Plasma ermöglicht. Im Koordinatensystem $\bar{F} = f$ (μg Aminosäure/0,5 ml Plasma) liest man ab, welche μg Menge der Aminosäure pro 0,5 ml Plasma dem errechneten relativen Wert entspricht, z.B.: für Phenylalanin: 100 μg Phe/0,5 ml Plasma ergeben den Wert $\bar{F} = 26$, also ist der Koeffizient: $100 : 26 = 3,8$.

Da der Peak d₁-Phe als 100 angenommen wird, muss man auch diesen Koeffizienten auf ihn relativieren (normalisieren), d.h.:

$$\frac{3,8}{100} = 0,038$$

Das ergibt schliesslich:

mg Gesamt Phe/100 ml Plasma = korr. Messwert normalisiert x 0,038 x 0,2

mg Gesamt Tyr/100 ml Plasma = korr. Messwert normalisiert x 0,087 x 0,2

Das gleiche Verfahren verwendet man auch für die Auswertung der deuterierten Aminosäuren.

Um diese rechnerischen Probleme noch deutlicher darzustellen, wird die Belastung einer gesunden Kontrollperson als Beispiel ausgewertet (Tabelle XV). Es handelt sich dabei um eine weibliche Person, 27 Jahre alt, die mit 9,4 g Phenylalanin-d₅ belastet worden ist.

Tabelle XV: Belastungsergebnisse der gesunden Kontrollperson

Probe	Phenylalanin			Tyrosin			$\bar{F} = \frac{\text{deut.Phe}}{\text{deut.Tyr}}$	log $\bar{F}$
	Gesamt:		Deut.	Gesamt:		Deut.		
	[%]			[%]				
	[mg/100ml Plasma]			[mg/100ml Plasma]				
	Phe	deut.Phe		Tyr	deut.Tyr			
vor	0,72	0	0	0,64	0	0	0	0
1 Std.	4,59	3,49	76,1	1,26	0,47	37,6	7,43	0,87
2 Std.	7,32	5,43	74,2	1,97	0,83	42,1	6,54	0,82
4 Std.	4,63	2,90	62,5	2,45	0,94	38,5	3,09	0,49

5.2.1.5. Genauigkeit, Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit des gesamten Verfahrens zu prüfen, hat man das gleiche Plasma zwölfmal analysiert. Die erhaltenen Werte ermöglichten die Ausrechnung der Standardabweichung (S) und des Variationskoeffizienten (VK), wie die folgende Tabelle (Tabelle XVI) zeigt:

Tabelle XVI Reproduzierbarkeit der Bestimmung

Parameter	$\bar{x} \pm s$	VK [%]
Gesamt Phe	11,36 $\pm$ 0,18 mg/100 ml Plasma	1,58
Gesamt deut.Phe	9,44 $\pm$ 0,15 mg/100 ml Plasma	1,59
Deuterierung	83,13 $\pm$ 0,59 %	0,71
Gesamt Tyr	2,38 $\pm$ 0,07 mg/100 ml Plasma	2,94
Gesamt deut.Tyr	1,05 $\pm$ 0,04 mg/100 ml Plasma	3,81
Deuterierung	44,14 $\pm$ 0,44 %	0,997

Die Nachweisgrenze lag bei 2,5 ng L-Phe oder L-Tyr/ml Plasma.

5.2.1.6. Resultate

Mit der oben beschriebenen Methode wurde eine ganze Reihe der Bestimmungen durchgeführt [208], wobei man folgende Personengruppen getestet hat:

1. Kontrollpersonen, d.h. gesunde Probanden (Nr. 1 - 5)
2. Patienten mit Hyperphenylalaninaemie (HPA), die keine phenylalaninarme Diät benötigen, normale IQ-Werte erreichen und deren Ausgangswerte für Phenylalanin im Plasma zwischen 3 und 10 mg/100 ml Plasma schwanken (Nr. 6 - 10)
3. Patienten mit rechtzeitig diagnostizierter Phenylketonurie, die ab der ersten Lebenswoche unter phenylalanin armer Diät sind, und 2 - 9 mg Phenylalanin/100 ml Plasma haben (Nr. 13 - 15)
4. Patienten mit spät diagnostizierter Phenylketonurie. Eine Person mit schwerer mentalen Retardierung und Verhaltensstörung. Die Ausgangswerte des Phenylalanins betrugen 13 - 22 mg/100 ml Plasma (Nr. 23)
5. Eltern von Patienten mit diagnostizierter PKU (Nr. 24) oder HPA (Nr.11), die von den Kontrollwerten abweichen (Heterozygoten ?).

Die erhaltenen Ergebnisse einiger Bestimmungen wurden in Abb. 41 graphisch zusammengestellt.

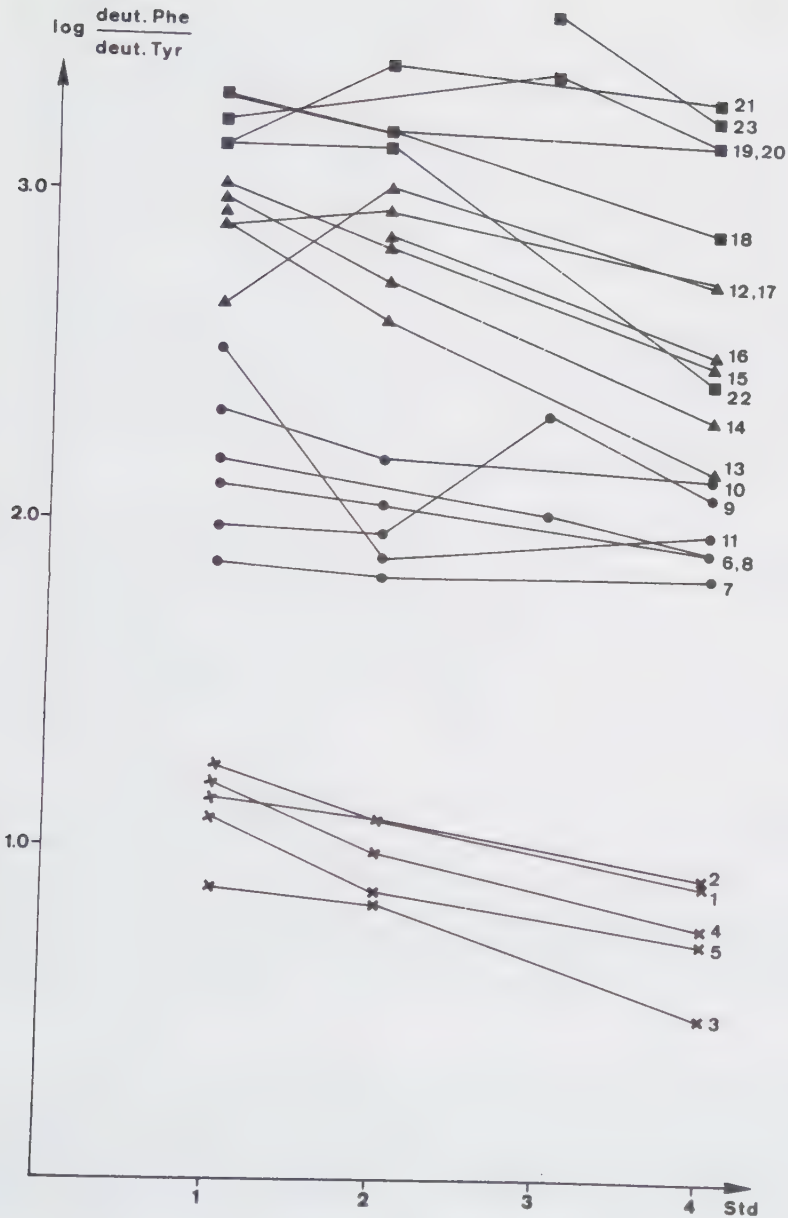


Abb.41 Graphische Darstellung einiger "in vivo" Enzymaktivitätsbestimmungen

Die Analyse der Resultate zeigte folgende sich wiederholende Merkmale:

Gruppe 1: Nach dem nicht sehr hohen Anstieg des Phenylalanins konnte man eine sehr schnelle Abnahme feststellen. Die entstandene Menge deuterierten Tyrosins erreichte ca. 2 Stunden nach Belastung das Maximum mit 1,3 mg/100 ml Plasma oder 49% der gesamten Tyrosin-Menge. Der dezimale Logarithmus des Quotienten deuteriertes Phenylalanin/deuteriertes Tyrosin lag bei ca. 1,0.

Gruppe 2: Der Anstieg des Phenylalanins ist grösser als in Gruppe I, die abfallende Tendenz konnte erst nach ca. 4 Stunden beobachtet werden. Die Menge des deuterierten Tyrosins lag mit 0,06 - 0,17 mg /100 ml Plasma (oder 6 - 11%) bedeutend tiefer und erreichte das Maximum nach 2 Stunden. Der Logarithmus betrug nach 1 Stunde 1,8 - 2,2 und unterschied sich somit deutlich von den Werten für die Gesunden.

Gruppe 3: Diese lässt sich, was den Abbau des Phenylalanins betrifft, nicht von Gruppe 2 unterscheiden. Dies ist isofern wichtig, als dieser Abbau bis jetzt als Standard-Test für die PKU-Diagnose gebraucht wurde. Das deuterierte Tyrosin war im Vergleich zu Gruppe 1 bedeutend, zu Gruppe 2 nur gering vermindert (0,01 - 0,02 mg deut. Tyr/100 ml Plasma (3%)). Die logarithmischen Werte (2,8 - 3,1) erlaubten eine deutliche Differenzierung zu den beiden vorangegangenen Gruppen.

Gruppe 4: Hier wurde ein sehr hoher Phenylalanin-Spiegel gemessen, wobei im Fall No. 10 die Kurve tiefer lag, weil der Patient vor und während der Belastung unter einer streng eingehaltenen Diät stand. Nur für diesen Patienten konnte eine Abnahme des Phenylalanins registriert werden. Es konnte kein deuteriertes Tyrosin gemessen werden ($\leq 0,01$ mg/100 ml Plasma). Auch hier erlaubte die logarithmische Darstellung eine übersichtliche Zuordnung der einzelnen Fälle.

Gruppe 5: Fall No. 24 ist der Vater eines Phenylketonurikers. Er wurde nie mit phenylalanin armer Diät behandelt, und obwohl die für ihn erhaltenen Werte das gleiche Bild wie für einen PKU-Patienten ergeben, weichen seine IQ-Werte nicht von den normalen ab. Man könnte ihn als PKU-Heterozygote bezeichnen(?).

Fall No. 11 ist die Mutter eines HPA-Patienten. Nach dem bis jetzt üblichen Test müsste man sie als Grenzfall zwischen Gruppe 1,2 und 3 betrachten, da die Phenylalanin-Kurve genauso verläuft. Das deuterierte Tyrosin wird wie bei der Gruppe 2 ausgeschieden. Auch der Logarithmus weist die Merkmale eines HPA-Patienten vor. Ein Heterozygot für HPA(?).

Die Aussagen für diese Gruppe sind jedoch mit einiger Vorsicht zu genießen, da die Werte nur Einzelfälle repräsentieren. Die Untersuchungen sind zu kostspielig (Körpergewicht grösser, dadurch auch grössere Mengen des deuterierten Belastungsmaterials nötig); ausserdem müssten pro Patient jeweils beide Eltern belastet werden.

Als Ausdruck für die tatsächliche Enzymaktivität des gesamten Phenylalanin-4-Monooxygenase-Systems wurde ein Mittelwert für das deuterierte Tyrosin (in mg/100 ml Plasma) zwei Stunden nach der Belastung mit deuteriertem Phenylalanin angenommen. Den Mittelwert der Kontrollpersonen (0,98 mg deut. Tyr/100 ml Plasma) hat man als 100% Aktivität willkürlich festgelegt:

Tab. XVII Vergleich der Enzymaktivität der verschiedenen Patientengruppen

Gruppe:	Diagnose:	Enzymaktivität: [%]
1	Gesunde	100
2	HPA	7 - 17
3	behandelte PKU	2 - 3
4	unbehandelte PKU	0
5	PKU-Heterozygote?	0
	HPA-Heterozygote?	14

Die nächste Tabelle (XVIII) zeigt alle vorgenommenen Bestimmungen nach Krankheitsgruppen geordnet (siehe Tab.XVII). Es wurden insgesamt 26 Belastungstests durchgeführt.

5.2.7 Direkte "in vitro" Enzymaktivität-Bestimmung

Die weiteren Versuche wurden unternommen, um mit der gleichen Messtechnik und unter Anwendung des ausgearbeiteten "Enzym assays" die Enzymaktivität in der Leber zu bestimmen. Es handelte sich dabei um Gewebeproben aus Nadelbiopsien. Die Entnahme der Gewebeproben wurde mit Rattenleber geübt, wobei

Tabelle XVIII : Zusammenstellung der indirekten "in vivo" Bestimmungen der

	Zeit nach Belast [St.]	Gruppe 1					Gruppe 2					Gr. 5	
		Fr. K 1	Herr K. 2	R.R. 3	S.A. 4	W.H. 5	L. 6	P. 7	R.D. 8	S.R. 9	A.M. 10	M.S. 11	G.M.L. 12
Gesamt phe [mg/100 ml Plasma]	0	1,19	1,34	0,72	0,98	1,13	4,60	5,14	3,0	2,75	5,47	1,04	3,87
	1	8,5	9,98	4,59	9,16	10,93	7,86	10,1	11,8	9,97	28,04	7,98	12,48
	2	11,98	12,03	7,32	12,42	9,57	12,41	18,43	-	16,41	30,93	12,62	14,02
	3	-	-	-	-	-	-	-	15,82	16,56	-	-	-
	4	10,43	8,94	4,63	9,12	7,09	20,03	20,14	-	-	32,94	11,64	15,47
	5	-	-	-	-	-	-	-	14,96	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28,82	-	-
	10	3,97	4,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	11,24	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	11,13	14,41	3,82	-	-	-	-
Gesamt Tyrosin [mg/100 ml Plasma]	0	0,98	1,05	0,64	0,74	1,56	0,75	1,55	0,65	3,34	0,92	0,62	0,73
	1	1,39	1,66	1,26	1,30	2,39	0,66	1,58	0,65	2,70	0,79	0,60	0,59
	2	2,02	2,04	1,97	2,38	2,71	0,97	2,32	-	2,70	0,89	0,98	0,50
	3	-	-	-	-	-	-	-	0,85	2,50	-	-	-
	4	2,48	2,25	2,45	2,62	2,84	1,32	2,42	-	-	1,71	0,72	0,62
	5	-	-	-	-	-	-	-	1,15	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,27	-	-
	10	2,51	2,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	1,76	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	2,02	2,05	1,12	-	-	-	-
deut. Tyrosin [mg/100 ml Plasma]	1	0,40	0,61	0,47	0,53	0,8	0,03	0,08	0,06	0,08	0,10	0,02	0,02
	2	0,86	0,82	0,83	1,14	1,12	0,06	0,17	-	0,15	0,14	0,14	0,01
	3	-	-	-	-	-	-	-	0,11	0,06	-	-	-
	4	1,02	0,82	0,94	1,28	1,0	0,13	0,16	-	-	0,14	0,10	0,02
	5	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-	-
	10	0,43	0,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	0,11	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	0,15	0,11	0,06	-	-	-	-
% deut. Tyrosin	1	29,1	36,6	37,6	33,5	33,4	4,9	4,8	8,6	3,0	12,3	3,3	2,8
	2	42,4	40,3	42,1	47,9	41,3	6,6	7,2	-	6,0	15,5	14,3	1,7
	3	-	-	-	-	-	-	-	13,5	2,4	-	-	-
	4	41,1	36,5	38,5	48,9	35,3	9,7	6,5	-	-	8,1	13,9	2,8
	5	-	-	-	-	-	-	-	18,8	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,4	-	-
	10	17,0	17,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	6,3	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	7,6	5,6	5,2	-	-	-	-
log $\frac{\text{deut. Phe}}{\text{deut. Tyr}}$	1	1,24	1,14	0,87	1,19	1,08	2,11	1,87	2,18	1,98	2,33	2,52	2,66
	2	1,08	1,09	0,82	0,98	0,86	2,05	1,83	-	1,96	2,19	1,89	3,02
	3	-	-	-	-	-	-	-	2,03	2,33	-	-	-
	4	0,89	0,91	0,49	0,76	0,71	1,92	1,84	-	-	2,15	1,97	2,74
	5	-	-	-	-	-	-	-	1,66	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,17	-	-
	10	0,49	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	1,53	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	1,15	1,23	0,75	-	-	-	-
% Enzymakt	2	87,8	83,7	84,7	116,3	114,3	6,1	17,3	11,2	15,3	14,3	14,3	1,0

Enzymaktivität von Phenylalanin-4-Monooxygenase (EC 1.14.16.1)

Gruppe 3			Gruppe ?									Gr.4	Gr.5	
V.I. 13	G.M.-P. 14	B. 15	Y.Z. 16	M.A. 17	B.M. 18	J.F. 19	M.K. 20	Sch.G. 21	Sch.D. 22	Th.	E.Z. 23	E.R.	M.Y.	
5,26	1,6	4,25	3,98	3,22	2,4	7,19	9,68	7,8	1,18	20,43	22,2	13,84	11,62	
13,15	22,8	14,19	22,04	29,63	23,5	23,79	31,07	22,0	16,08	24,42	29,1	24,62	24,07	
13,01	27,1	17,88	20,2	34,37	22,5	23,27	22,54	33,5	17,56	-	36,16	26,92	33,9	
-	-	-	-	-	-	-	36,42	-	-	-	-	27,28	-	
12,14	27,3	18,06	20,27	31,95	23,9	23,86	32,84	30,7	16,78	27,80	38,95	24,70	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	20,92	-	-	21,85	-	-	16,38	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	15,88	-	-	-	-	-	-	-	-	30,29	-	-	
0,8	0,64	1,22	0,63	0,91	0,8	1,05	0,78	0,7	1,03	0,55	0,56	0,98	0,79	
0,56	0,7	1,17	0,81	0,68	0,8	0,78	0,93	0,56	0,74	0,61	0,51	0,66	0,64	
0,54	0,8	0,87	0,73	0,81	0,7	0,77	0,52	0,53	0,68	-	0,49	0,68	0,61	
-	-	-	-	-	-	-	0,59	-	-	-	-	0,77	-	
0,63	0,9	0,67	0,94	1,05	0,8	1,32	0,89	0,73	1,63	0,84	0,57	0,7	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	1,19	-	-	1,45	-	-	1,63	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	1,06	-	-	-	-	-	-	-	-	0,72	-	-	
0,01	0,02	0,01	0,02	0,03	0,01	0	0,012	0,008	0,01	0,004	0	0	0	
0,02	0,04	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	0	0,008	0,01	0	0,002	0	0,00	
-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	0,004	-	
0,005	0,09	0,04	0,04	0,04	0,02	0,01	0,012	0,015	0,04	0	0,01	0	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	0,03	-	-	0,01	-	-	0,03	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	
2,0	3,3	0,9	2,74	4,7	1,4	0	1,3	1,5	1,1	0,7	0	0	0	
2,8	5,2	2,5	3,32	3,7	1,7	1,0	0	1,5	0,8	0	0,4	0	0,3	
-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-	-	0,6	-	
7,9	9,4	6,0	4,38	3,4	2,4	1,0	1,3	2,0	2,3	0	2,1	0	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	2,40	-	-	0,8	-	-	2,1	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	
2,92	2,98	3,02	2,94	2,90	3,3	-	3,22	3,15	3,14	3,21	-	-	-	
2,61	2,73	2,84	2,87	2,95	3,2	3,19	-	3,4	3,14	-	3,89	-	5,30	
-	-	-	-	-	-	-	3,37	-	-	-	-	3,47	-	
2,16	2,32	2,49	2,52	2,74	2,9	3,16	3,18	3,3	2,44	-	3,25	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	2,56	-	-	3,0	-	-	2,41	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	2,26	-	-	-	-	-	-	-	-	2,84	-	-	
2,0	4,1	2,0	2,0	3,1	1,0	1,0	0	0,8	1,0	0	0,2	0	0,01	

man versuchte, die Nadelbiopsie-Bedingungen nachzuahmen. Zuerst hat man durch den Einstich in die Lebermasse mit einer dicken Nadel die Gewebeentnahme vollzogen. Die Streuung der somit erhaltenen Werte für die Enzymaktivität bei 20 verschiedenen Entnahmen aus der gleichen Leber betrug 280-325%. Deswegen hat man mit einem Skalpell die äussere Leberhülle abgetrennt und dann aus der Leber die Probe herausgeschnitten. Gewichtsmässig waren diese Proben zwischen 10 und 30 mg schwer. Die entnommenen Proben hat man im "Virtis-45 Homogeniser" in 0,2 ml Natriumphosphatpuffer (0,2M; pH 7,6) unter Anwendung eines Microgefässes homogenisiert (und zwar 3 x 30 Sekunden bei maximaler Umdrehungszahl, im Eisbad gekühlt). Somit erreichte man für die Serie von 20 Proben aus der gleichen Leber eine Streuung der Werte von 150-190%, und ging deswegen zu einer anderen Homogenisationsmethode über. Die entnommenen Leberschnitten wurden in Cellulosenitratröhrchen (Beckman, Art.No.305528), die gleichzeitig als Zentrifugiergefässe dienen konnten, mit 0,2 ml Natriumphosphatpuffer (0,2M; pH 7,6) übertragen. Die Homogenisierung führte man direkt in diesen Röhrchen (im Eisbad eingetaucht) mit einem "Methrohm"-Handbohrer, der mit speziell angefertigten Teflonstäben ausgerüstet worden ist, durch. Nach dreimaliger Homogenisierung während 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit wurden die Proben 30 Minuten lang bei ca. 24'000 x g in einer Sorvall- Kühlzentrifuge (SE-12 Rotor) zentrifugiert. Den Niederschlag nahm man in 0,1 ml frischem Puffer auf und homogenisierte und zentrifugierte ihn auf gleiche Weise wie vorher. Die beiden Ueberstände wurden vereinigt und für die weiteren Untersuchungen verwendet. 2 x 25 µl des Ueberstandes wurden zur Micro-Biuret-Eiweisssbestimmung verwendet (siehe Kapitel 2.2.2.). 2 x 0,1 ml der Proben brauchte man für den Ansatz zum "Enzyme assay" (wie detailliert im Kapitel 2.2.1. beschrieben wurde).

Der Nachweis des entstehenden L-Tyrosins erfolgte:

- a) kolorimetrisch - 1-Nitroso-2-naphthol Reaktion
- b) gaschromatographisch - mit 0,5 µmol 4-Chlor-DL-phenylalanin als interner Standard
- c) GC-MS/SIM-Technik - mit 0,5 µmol 4-[²H]-L-Phenylalanin und 0,005 µmol [²H]₇-L-Tyrosin als interne Standards

wobei die Methoden b) und c) eine zusätzliche Vorreinigungsstufe mittels Ionenaustauschersäulen beinhalteten (Details siehe Kapitel 2.2.3.4).

Für die Serien, 2 mal je 20 Proben, musste man folgende Abweichung der Werte feststellen:

- a) 4,06 - 6,36 mIE
- b) 16,67 - 24,52 mIE
- c) 16,91 - 23,81 mIE

wobei 1 IE (internationale Einheit) der spezifischen Enzymaktivität, dieser Menge des Enzyms entspricht, die zur Entstehung 1 μ mol L-Tyrosin pro 1 mg Protein in 1 Minute benötigt wird.

Die kolorimetrische Methode ergab bei dieser Bestimmung immer ca. 4 bis 5-fach niedrigere Werte als die GC und GC-MS/SIM-Methoden. Die Streuung liegt für jede Nachweismethode mit 41 - 57% immer noch zu hoch, um für eine analytische Bestimmung akzeptabel zu sein. Die qualitative Bestimmung für die diagnostische Zwecke wäre jedoch hiermit möglich.

Es ist möglich, dass diese Ergebnisse für grössere Lebern (z.B. bei Menschen) verbessert werden können, aber es bleibt immer noch fraglich, ob dies eine empfehlenswerte Messtechnik ist. Sie muss auch aus ethischen Gründen angezweifelt werden, solange eine alternative und für die Patienten weniger belastende Bestimmung mit indirekter "in vivo" Messung zur Verfügung steht.

5.3. Diskussion und Zusammenfassung

Eine spezifische Methode der quantitativen Analyse des deuterierten und nichtdeuterierten Phenylalanins und Tyrosins im menschlichen Blutplasma mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie/SIM wurde ausgearbeitet. 4- $[2H]$ -L-Phenylalanin und $[2H]$ -L-Tyrosin wurden als interne Standards verwendet. Die Empfindlichkeit dieser Methode setzt die Nachweisgrenze auf 2,5 ng/ml Plasma sowohl für Phenylalanin, wie auch für Tyrosin herab. Der Variationskoeffizient beträgt ca. 1,6% (n = 12) für die Phenylalanin- und ca. 3,0% (n = 12) für die Tyrosin-Bestimmung.

Mit der Anwendung dieser Messtechnik ist eine indirekte "in vivo" Bestimmung der Aktivität der Phenylalanin-4-Monooxygenase beim Menschen durch Belastung mit deuteriertem 2,3,4,5,6- $[2H]$ -L-Phenylalanin (das als Substrat akzeptiert wird) durchführbar. Sie erfolgt mit der Messung des gebildeten deuterierten 2,3,5,6- $[2H]$ -L-Tyrosins und des restlichen, nicht metabolisierten 2,3,4,5,6- $[2H]$ -L-Phe. Die Methode erlaubt eine spezifische Unterscheidung zwischen Phenylketonurie-, Hyperphenylalaninaemie-Patienten und gesunden Personen. Der logarithmische Ausdruck für den Quotienten deut.Phe./deut. Tyr erlaubt eine zuverlässige Differenzierung zwischen den erwähnten Gruppen. Eine Plasmaprobe von nur 0,5 ml ist ausreichend. Es ist nochmals zu betonen, dass der Test (bis jetzt als Standardprobe im Gebrauch) für die

zeitabhängige Abnahme des Phenylalanins nach einer Belastung mit Phenylalanin [209,210] im Gegensatz zu der hier beschriebenen Methode keine deutliche, differenzierte Diagnose im Bezug auf die verschiedenen Patientengruppen erlaubt. Die Ermittlung der heterozygoten Krankheitsträger scheint möglich, was aber erst noch bestätigt werden muss. Dies sollte um so einfacher sein, da die Menge des Belastungsmaterials bis zu einem Fünftel der bis jetzt benötigten herabgesetzt werden kann. Diese Erhöhung der Empfindlichkeit konnte mit der Verbesserung der SIM-Technik erreicht werden.

Das Herabsetzen der Dosis verlangt jedoch eine Wiederholung der Kontrollbelastungen, was die folgende Abbildung beweist. Es sind die Werte für zwei Belastungen an der gleichen Kontrollperson dargestellt, wobei die erste mit 200 mg, die zweite dagegen mit 50 mg 2,3,4,5,6- $[^2\text{H}]_5$ -L-Phenylalanin pro Kilogramm Körpergewicht vorgenommen worden ist.

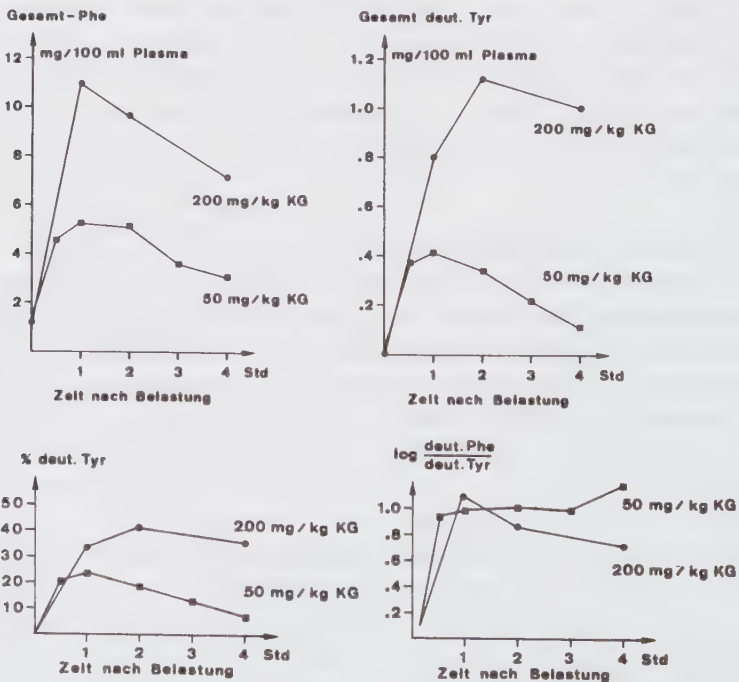


Abb.42 Vergleich der Belastungen mit 200/50mg $[^2\text{H}]_5$ -L-Phe/Kg Körpergewicht

Die Umrechnung der Werte anderer Gruppen ist ohne die praktische Bestätigung zu unsicher. Ueber die Möglichkeit des Ersetzens der Ionenaustausch-Säulenchromatographie durch die HPLC-Technik und somit Vereinfachung und Beschleunigung des Trennverfahrens wurde schon im Kapitel 2.3. diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. "Enzyme nomenclature - Recommendations (1978) of the Nomenclature Committee of the IUB (International Union of Biochemistry)", Academic Press, New York 1979, pp.124-125
2. A. Følling - *Z.Physiol.Chem.* 227,169(1934)
3. AR.Moss und R.Schoenheimer - *J.Biol.Chem.* 135,415(1940)
4. G.A. Jervis - *J.Biol.Chem.* 169,651(1947)
5. G.A. Jervis - *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.* 82,512(1953)
6. S. Udenfriend und J.R. Cooper - *J.Biol.Chem.* 194,503-511(1952)
7. S. Kaufman - *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 9,497(1962)
8. Jasim M. Al-Janabi - *Arch.Biochem.Biophys.* 200,603-608(1980),No.2
9. June A. Ayling, G.R. Boehm, S.C. Textor und R.A. Pirson - *Biochemistry*, 12,2045-2051(1973)
10. C. Bublitz - *Biochim.Biophys.Acta* 191,249(1969)
11. M.A.A. Namboodiri und T. Ramasarma - *Biochem.J.* 150,263-268(1978)
12. Stephanie Weber, G. Harzer und J.M. Whiteley - *Anal.Biochem.* 106,63-72(1980)
13. V.G. Zannoni - *Biochem.Med.* 16,251-253(1976)
14. P.J. Christensen - *Scand.J.Clin.Lab.Investig.* 14,623-628(1962)
15. H. Nakata und H. Fujisawa - *Biochim.Biophys.Acta*, 614,313-327(1980)
16. B.N. La Du und V.G. Zannoni in "Proc. of Conference on Treatment of PKU and Allied Diseases" eds. J.A. Anderson and K.F. Swaiman - US Government Printing Office, Washington DC (1967), pp.193-204
17. Ch. Mitoma - *Arch.Biochem.Biophys.* 60,476-484(1956)
18. K.H. Nielsen - *Europ.J.Biochem.* 7,360-369(1969)
19. D.A. Brase und Th.C. Westfall - *Biochim.Biophys.Acta* 309,271-279(1973)
20. A. Tourian - *Biochim.Biophys.Acta*, 242,345-354(1971)
21. R. Shiman, D.W. Gray und A. Pater - *J.Biol.Chem.* 254,11300-11306(1979)
22. R. Shiman und D.W. Gray - *J.Biol.Chem.* 255,4793-4800(1980)
23. S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 234,2677-2682(1959),No.10
24. S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 245,4751-4759(1970),No.18
25. M.R. Miller, D. Mc Clure und R. Shiman - *J.Biol.Chem.* 250,1132-1140(1975) No.3
- 25a. L.I. Woolf, A. Jakubovič und E. Chan-Henry - *Biochem.J.* 125,569-574(1971)
26. G. Guroff - in "Methods in Enzymology" 17A,597-603(1969),No.[74]
27. I.S. Ishimitsu, S. Fujimoto und A. Chara - *Chem.Pharm.Bull.* 28,1635-1655(1980),No.5
28. R.G.H. Cotton - *Biochim.Biophys.Acta* 235,61-72(1971)

29. A.R. Brennenman und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 240,3617(1965)
30. A. Tourian, Lucy Treiman und K. Abé - *Biochemistry* 14,4055-4060(1975), Nr.18
31. L.I. Murthy und H.K. Berry - *Biochem.Med.* 12,392-397(1975)
32. A. Tourian, J. Goddard und T.T. Puck - *J.Cellular Physiol.* 73,159(1969)
33. S. Kaufman - *Arch.Biochem.Biophys.* 134,249(1969)
34. June A. Ayling, W.D. Pirson, J.M. Al-Janabi und G.D. Helfand - *Biochemistry* 13,78-85(1974),Nr.1
35. H. Nakata, T. Yamauchi und H. Fujisawa - *J.Biol.Chem.* 254,1829-1833(1979)
36. C.H. Letendre, G. Dickens und G. Guroff - *J.Biol.Chem.* 250,6672-6678(1975) Nr.17
37. D.F. Haggerty, G. Popjak und Peggy L. Young - *J.Biol.Chem.* 251,6901-6908 (1976),No.22
38. S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 226,511(1957)
39. S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 230,931(1958)
40. S. Kaufman - *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 50,1085(1963)
41. W.W. Cleland - *Biochim.Biophys.Acta*, 67,188(1963)
42. T. Skotland und T. Ljones - *Inorganic Perspectives in Biol.Med.* 2,151-180 (1979)
43. V. Mäsey und P. Hemmerich - "Flavin and pteridine monooxygenases" in "The Enzymes", Vol.XII, Part B, 3rd Ed., Bayer 1975, pp. 231-238
44. J.P. Hénichart, J.L. Bernier, J.L. Dhondt, M. Dautrevaux und G. Biserte - *Biomedicine*, 31,6-7(1979)
45. S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 237,PC 2712(1962)
46. S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 239,332-338(1964)
47. M. Viscontini und A. Bobst - *Helv.Chim.Acta*, 48,816-822(1966)
48. M. Viscontini und A. Bobst - *Helv.Chim.Acta*, 49,1915(1966)
49. M.C. Archer - *Canad.J.Biochem.* 48,278(1970)
50. M.C. Archer - *Canad.J.Biochem.* 48,526(1970)
51. P. Hemmerich - in "Proceedings of the Third International Pteridine Symposium", Stuttgart, W.Germany, Pergamon Press, Oxford, England 1962, p.143
52. S. Kaufman - in "Chemistry and Biology of Pteridines", ed. W. Pfleiderer, de Gruyter, Berlin 1975, pp.291-304
53. G. Guroff - *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 24,720(1967) und G. Guroff - *Science*, 157,1524(1967)
54. S. Kaufman und D.B. Fisher - in "Molecular Mechanism of Oxygen Activation" ed. O. Hayashi, Academic Press, New York 1974, p.285
55. D.M. Jerina und J.W. Daly - *Science*, 185,573(1974)
56. G. Guroff, K. Kondo und J. Dalz - *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 25,622(1966)
57. J. Daly und G. Guroff - *Arch.Biochem.Biophys.* 125,136(1968)

58. J.R.L. Smith, D.M. Jerina, S. Kaufman und S. Milstien - *J.Chem.Soc.Chem. Commun.* 881(1975)
59. G.I. Dmitrienko, V. Snieckus und T. Viswanatha - *Bioorgan.Chem.* 6,421-429 (1977)
60. W. Berends, J. Posthuma, J. Sassenkach und H. Mager - in "*Flavins and Flavoproteins*" ed. E.C. Slater, Elsevier, New York 1966, p.22
61. H.W. Orf und D. Dolphin - *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 71,2646(1974)
62. G.A. Hamilton - in "*Progress in Bioorganic Chemistry*", eds. E.T. Kaiser and F.G. Kézdy- Vol.I, Wiley-Interscience, New York 1971, pp.83-157
63. R.E. Keay und G.A. Hamilton - *J.Amer.Chem.Soc.* 97,6876(1975) und R.E. Keay und G.A. Hamilton - *J.Amer.Chem.Soc.* 98,6578-6582(1976)
64. S.K. Chaudhary, R.A. Hoyt und R.W. Murray - *Tetrahedron Lett.* 4235(1976)
65. F. Mc Capra - *Acc.Chem.Res.* 9,201(1976)
66. G.B. Payne - *Tetrahedron*, 18,763(1962)
67. D.M. Jerina - *Chem.Techn.* 120(1973)
68. G.A. Hamilton - in "*Molecular Mechanism of Oxygen Activation*"- ed. O. Hayashi, Academic Press, New York 1974, pp.405-451
69. M. Viscontini - in "*Chemistry and Biology of Pteridines*", eds. K. Iwai, M. Akino, M. Goto and Y. Iwanami, Intern.Academic Printing Co.,Tokyo 1970, pp.217-224
70. A. Ehrenberg, P. Hemmerich, F. Müller, T. Okada und M. Viscontini - *Helv. Chim.Acta*, 15,411(1967)
71. A. Bobst - *Helv.Chim.Acta*, 51,607(1968)
72. R.A. Lazarus, D.E. Wallich, R.F. Dietrich, D.W. Gottschal, S.J. Benkovic, B.J. Gaffney und R. Shiman - *Fed.Proc.* 41,2605-2607(1982),No.9
73. N.J. Turro, V. Ramamurthy, K.-C. Lui, A. Krebs und R. Kemper - *J.Amer. Chem.Soc.* 98,6758(1976)
74. M.J.S. Dewar, A.C. Griffin, W. Thiel und I.J. Turchi - *J.Amer.Chem.Soc.* 97,4439(1975)
75. R.G.H. Cotton - *Intern.J.Biochem.* 8,333-341(1977)
76. L.J. Woolf - *Biochem.Med.* 16,284-291(1976)
77. S.Su. Gillan, S.L.C. Woo und L.I. Woolf - *Biochem.J.* 139,741(1974)
78. E. Jedlicki, S. Kaufman und S. Milstien - *J.Biol.Chem.* 252,7711-7714(1977) No.21
79. J. Donlon und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 253,6657-6659(1978),No.19
80. M. Wretborn, Elizabeth Humble, U. Ragnarson und L. Engström - *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 93,403-408(1980),No.2
81. G. Guroff und C.A. Rhoads - *J.Biol.Chem.* 242,3641(1967)
82. S. Kaufman - in "*Methods in Enzymology*", 5,809-816(1962),No.[109]
83. Ch.Y. Huang, E.E. Max und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 248,4235-4241(1973), No.12
84. Ch.Y. Huang und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 248,4242-4251(1973),No.12

85. D.B. Fisher und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 248,4345-4353(1973),No.12
86. S. Kaufman und Kaarin Mason - in "*Oxygenases and Oxygen Metabolism*" - Academic Press Inc. 1982 , ISBN 0-12-522 780-9, pp.305-320
87. M.A.A. Namboodiri und T. Ramasarma - *Indian J.Biochem.Biophys.* 15,178-182(1978)
88. M.A.A. Namboodiri, S.P. Bhat und T. Ramasarma - *Indian J.Biochem.Biophys.* 15,173-177(1978)
89. J.-P.Abita, S. Milstien, N. Chang und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 251,5310-5314(1976),No.17
90. S. Milstien, J.-P. Abita, N. Chang und S. Kaufman - *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* , 73,1591-1593(1976),No.5
91. J.L.Dhondt, J.P. Hénichart, J.L. Bernier und M. Dautrevaux - *Biochimie*, 62,185-186(1980)
92. B.K. Koe und A. Weissman - *J.Pharmacol.Exp.Theor.* 154,499-516(1966)
93. N.Chang, S. Kaufman und S. Milstien - *J.Biol.Chem.* 254,2665-2668(1979), No.8
94. Olga Greengard und J.A. Del Valle- *Biochem.J.* 154,619-624(1976)
95. F. Valdiveso, C. Gimenez und F. Mayor - *Biochem.Med.* 12,72-78(1975)
96. T. Nagatsu, Y. Numata (Sudo), T. Kato, K. Sugiyama und M. Akino - *Biochim.Biophys.Acta*, 523,47-52(1978)
97. R.A. Wapnir und G.S. Moak - *Biochem.J.* 177,347-352(1979)
98. T.V. Gopalakrishnan und W. French Anderson - *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 76,3932-3936(1979),No.8
99. D.F. Haggerty, P.L. Young und I.V. Buere - *Dev.Biol.* 40,16-23(1974)
100. Moussa B.H. Youdim, B. Mitchell und H.F. Woods - *Biochem.Soc.Transactions* 557-th Meeting, Liverpool, 3,683-684(1975)
101. S. Kaufman - *Biochem.Biophys.Acta*, 51,619-621(1961)
102. J. Renson, H. Weissbach und S. Udenfriend - *J.Biol.Chem.* 237,2261(1962)
103. J.H. Tong, A. D'Iorio und M.L. Benoiton - *Biochim.Biophys.Res.Comm.* 44,229(1971)
104. P.M. Nair und L.C. Vining - *Phytochemistry* , 4,401-411(1965)
105. S. Katoh und T. Sueoka - *Int.J.Biochem.* 15,57-64(1982),No.1
106. J.A. Del Valle und Olga Greengard - *Biochem.Med.* 20,247-255(1978)
107. B. Weiss, Maria Hui und A. Lajtha - *Biochem.Med.* 18,330-343(1977)
108. B. Weiss, Maria Hui und A. Lajtha - *Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol.* 18,709-721(1977),No.4
109. B. Weiss, Maria Hui und A. Lajtha - *Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol.* 22,365-373(1978)
110. B. Weiss, Maria Hui und A. Lajtha - *Brain Res.Bull.* 3,391-394(1978)
111. B. Weiss, Maria Hui und A. Lajtha - *Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol.* 25,153-164(1979),No.1

112. L.I. Woolf - *Biochem.J.* 125, 569-574 (1971)
113. S.W. Bailey und June A. Ayling - *Biochim.Biophys.Res.Common.* 85, 1614-1621 (1978), Nr. 4
114. S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 254, 5150-5154 (1979), Nr. 12
115. C. Bublit - *Biochem.Med.* 17, 13-19 (1977)
116. E.L. Loechler und Th.C. Hollocher - *J.Amer.Chem.Soc.* 102, 7312-7321 (1980), Nr. 24
117. E.L. Loechler und Th.C. Hollocher - *J.Amer.Chem.Soc.* 102, 7322-7327 (1980), Nr. 24
118. E.L. Loechler und Th.C. Hollocher - *J.Amer.Chem.Soc.* 102, 7328-7334 (1980), Nr. 24
119. S. Milstien und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 250, 4777-4781 (1975), Nr. 12 und S. Milstien und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 250, 4782 (1975), Nr. 12
120. R. Shiman - *J.Biol.Chem.* 255, 10029-10032 (1980)
121. D. Koshland, G. Nemethy und D. Filmer - *Biochemistry* 5, 365-385 (1966)
122. N.E. Good, G.D. Winget, Wilhelmina Winter, T.N. Conolly, S. Izawa und R.M.M. Singh - *Biochemistry* 5, 467-477 (1966), Nr. 2
123. Ch.W. Gehrke, D. Roach, R.W. Zumwalt, D.L. Stalling und L.L. Wall - *Anal. Biochem.Lab.Inc.* 1968, Columbia, Missouri, Library of Congress Catalog, Card No. 68 - 57507
124. R.K. Hill und G.R. Newkome - *J.Amer.Chem.Soc.* 91, 5893 (1969)
125. D. Onderka und H.G. Floss - *J.Amer.Chem.Soc.* 91, 5894 (1969)
126. G.W. Kirby und L. Ogunkaya - *J.Chem.Soc.* 6914 (1965)
127. A.J. Williams, A.T. Morse und R.S. Stuart - *Canad.J.Microbiol.* 12, 167 (1966)
128. J.G. Atkinson, J.J. Csakavary, G.T. Herbert und R.S. Stuart - *J.Amer. Chem.Soc.* 90, 498 (1968)
129. J.G. Atkinson und J.J. Csakavary - *Canad.Pat.* 795371 (Appl. for Oct. 23, 1967)
130. A.F. Thompson und N.H. Cromwell - *J.Amer.Chem.Soc.* 61, 1374 (1939)
131. J.A. McCubbin, R.Y. Moir und G.A. Neville - *Canad.J.Chem.* 48, 942 (1970)
132. T. Okuda und Y. Fujii - *Bull.Chem.Soc.Jpn.* 30, 698 (1957), No. 7
133. A.T. Blomquist, R.J. Cedergren, B.F. Hiscock, S.L. Tripp und D.N. Harp - *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 55, 453-456 (1966), No. 3
134. S. Tokuhisa, H. Yoshikawa, S. Ichihara und S. Baba - *Radioisotopes*, 26, 630-634 (1977)
135. R.G.H. Cotton - *Eur.J.Biochem.* 60, 427-430 (1975)
136. T.P. Waalkes und S. Udenfriend - *J.Lab.Clin.Med.* 50, 733 (1957)
137. E.S. Guzman Barron, J. Ambrose und P. Johnson - *Radiation Res.* 2, 145 (1955)
138. S. Udenfriend und J.R. Cooper - *J.Biol.Chem.* 196, 227-233 (1952)
139. S. Udenfriend - in *"Methods in Enzymology"*, Vol. 3, 610-613 (1957), No. [87]
140. B.T.N. La Du und J. Michael - *J.Lab.Clin.Med.* 55, 491 (1960)

141. Amino Acids and Related Substances - Chapter 18 in - "*Clinical Chemistry- Principles and Techniques*" eds. R.J. Henry, D.C. Cannon and J.W. Winkelman - Med.Dept., Harper & Row Publ., Hagerstown, Maryland 1974, pp. 604-605
142. V.E. Bower und R.G. Bates - *J.Res.Natn.Bur.Stand.* 55,197(1955)
143. "*Data for Biochemical Researches*" ed. R.M.C. Dawson et al., Oxford 1969, p. 487
144. R.G. Bates und V.E. Bower - *Anal.Chem.* 28,1322(1956)
145. G. Gomori - *Meth.Enzymol.* 1,138-148(1955)
146. S.P. Mann - *J.Neurochem.* 31,747-749(1978)
147. R.F. Itzhaki und D.M. Gill - *Anal.Biochem.* 9,401-410(1964)
148. S. Zamenhof - *Meth.Enzymol.*, Vol.III, 696-703(1957)
149. Th. Warburg und A. Christian - *Biochem.Z.* 310,384(1942)
150. O.H. Lowry, M.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall - *J.Biol.Chem.* 193,265-267(1951)
151. O. Gerngross, K. Voss und T. Herfelt - *Ber.* 66,435(1933)
152. Ch.W. Gehrke, H. Nakamoto und R.W. Zumwalt - *J.Chromatogr.* 45,24(1969)
153. Ch.W. Gehrke und K. Leimer - *J.Chromatogr.* 57,219(1971)
154. M. Donike - *J.Chromatogr.* 115,591(1975)
155. M. Donike - *J.Chromatogr.* 103,91(1975)
156. M. Schwarz und G. Michael - *J.Chromatogr.* 118,101(1976)
157. S.L. Mac Kenzie und D. Tenaschuk - *J.Chromatogr.* 97,19(1974)
158. S.L. Mac Kenzie und D. Tenaschuk - *J.Chromatogr.* 111,413(1975)
159. R.J. Siezen und T.H. Mague - *J.Chromatogr.* 130,151(1977)
160. R. Zeynek - *Z.physiol.Chem.* 114,275(1921)
161. R. Zeynek - *Bull.Soc.Chim.Biol.* 37,255(1955)
162. V. du Vigneaud und C.E. Meyer - *J.Biol.Chem.* 98,295-308(1932), Nr.1
163. D.W. Thomas, B.C. Das, S.D. Géro und E. Lederer - *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 32,519-525(1968), Nr.3
164. S. Ishimitsu, S. Fujimoto und A. Ohara - *Chem.Pharm.Bull.* 28,992(1980)
165. S. Kaufman und D.B. Fisher - *J.Biol.Chem.* 245,4745-4750(1970)
166. P. Cuatrecasas und Ch.B. Anfinsen - in "*Methods in Enzymology*" 22,345-385(1974)
167. J. Turková - *J.Chromatogr. Library*, Vol.12, Elsevier, Amsterdam 1978, "*Affinity Chromatography*"
168. Pharmacia Fine Chemicals Co., Sweden - "*Affinity Chromatography: Principles and Methods*" 1979 - 1
169. R.G.H. Cotton - *FEBS Letters* 44,290-292(1974),Nr.3
170. Pharmacia Fine Chemicals Co., Sweden - "*Octyl-Sepharose CL-4B, Phenyl-Sepharose CL-4B for Hydrophobic Interaction Chromatography*" 1976 - 1

171. E.A. Peterson und H.A. Sober - *Anal.Chem.* 31,857(1959)
172. R.G.H. Cotton und I.G. Jennings - *Eur.J.Biochem.* 85,357-363(1978)
173. U.K. Laemmler - *Nature* 227,680-685(1970)
174. K. Weber und M. Osborn - in "*The Proteins*" - eds. H. Neurath and H.R. Hill, Third Edition, Vol.1, Academic Press, New York 1975, pp.179-223
175. R.E. Baker und R. Shiman - *J.Biol.Chem.* 254,9633-9639(1979)
176. R.J. Leeming - *Arch.Dis.Child.* 51,771(1976)
177. H. Rembold und W.L. Guyre - *Angew.Chem.* 84,1088-1099(1972), Nr.22
178. E.C. Taylor - in "*Chemistry and Biology of Pteridines*" ed. W. Pfeleiderer, W. de Gruyter, Berlin 1975, pp. 541-570
179. M. Viscontini und R. Provenzale - *Helv.Chim.Acta* 51,1495(1968)
180. M. Viscontini, R. Provenzale, S. Ohlgart und J. Malevalle - *Helv.Chim.Acta* 53,1202(1970)
181. M. Matsubara, S. Katoh, M. Akino und S. Kaufman - *Biochim.Biophys.Acta* 122,202-212(1966)
182. June E. Ayling und S.W. Bailey - *Fed.Proc.* 37,1345(1978)
183. S.W. Bailey und June E. Ayling - *J.Biol.Chem.* 255,7774-7781(1980),Nr.16 &
S.W. Bailey und June E. Ayling - in "*Chemistry and Biology of Pteridines*"
eds. R.L. Kisliuk & G.M. Brown, Elsevier, New York 1979, pp. 171-176
184. D.E. Fisher und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 247,2250(1972)
185. M.Osanai und H. Rembold - *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 352,1359(1971)
186. C.B. Storm und S. Kaufman - *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 32,788(1968)
- 186a.B. Schircks, J.H. Bieri und M. Viscontini - *Helv.Chim.Acta* 60,211(1977)
187. H.-J. Furrer, J.H. Bieri und M. Viscontini - *Helv.Chim.Acta* 62,2577-2580
(1979)
188. S.W. Bailey und June E. Ayling - *J.Biol.Chem.* 253,1598-1605(1978),Nr.5
189. H. Hasegawa, S. Imaizumi, A. Ichiyama, T. Sugimoto, S. Matsuura, K. Oka,
T. Kato, T. Nagatsu und M. Akino - in - Pos.183 , p.183
190. S. Matsuura, T. Sugimoto, H. Hasegawa, S. Imaizumi und A. Ichiyama -
J.Biochem. 87,951-957(1980)
191. R.L. Blakley - in "*The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*"
(North-Holland Research Monographs - "Frontiers of Biology"- Vol.13),
North-Holland Publ.Comp., Amsterdam 1969
192. J.E. Craine, S. Hall und S. Kaufman - *J.Biol.Chem.* 247,6082-6091(1972)
193. W. Pschyrembel - "*Klinisches Wörterbuch mit klinischen Syndromen*" -
W. de Gruyter, Berlin 1975, S. 447 und 935
194. W.E. Knox - in "*The metabolic basis of inherited disease*" eds. J.B. Stan-
bury, J.B. Wyngaarden & D.S. Fredrickson, McGraw-Hill Book Co., New York
1972, pp. 744 - 762
195. W. Prellwitz - "*Klinisch-chemische Diagnostik*" - Georg Thieme Verlag,
Stuttgart 1976, S. 165

196. Müller-Seifert - "*Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik*" - ed. H. Frh. von Kress, Verlag von J.F. Bergmann, München 1975, pp.283 u. 292
197. S.M. Rapoport - "*Medizinische Biochemie*" - VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1977, pp. 436,452 u. 851
198. D. Yi-Yung Hsia - "*Inborn errors of metabolism*" - The Year Book Publ.Inc. Chicago 1966, p.132
199. Ch. Mitoma, R.M. Auld und S. Udenfriend - *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.* 94, 634(1957)
200. S. Kaufman - *Science*, 128,1506(1958)
201. "*Biochemical disorders in human disease*" - eds. R.H.S. Thompson and E.J. King, J.&A. Churchill Ltd., London 1964, pp.744-762
202. R. Koch, M. Blaskovics, Elisabeth Wenz, K. Fishler und Graciela Schäfler - in "*Heritable disorders of amino acid metabolism: patterns of clinical expression and genetic variation*" - ed. W.L. Nyhan, J. Wiley & Sons, New York 1974, p.109
203. S. Kaufman, N.A. Holtzman, S. Milstien, I.J. Butler und A. Krumholz - *New England J.Med.* 293,785-790(1975)
204. A. Niederwieser, H.-Ch. Curtius, O. Bettoni, J.H. Bieri, B. Schircks, M. Viscontini und J. Schaub - *Lancet I*, 131(1979)
205. A. Niederwieser, H.-Ch. Curtius, M. Viscontini, J. Schaub und H. Schmidt-*Lancet I*, 550(1979)
206. F.K. Trefz, D.J. Byrd, M.E. Blaskovics, W. Kochen und P. Lutz - *Clin. Chim.Acta*, 73, 431(1976)
207. Maria-Jolanta Zagalak, H.-Ch. Curtius, W. Leimbacher und U. Redweik - *J.Chromatogr.* 142,523-531(1977)
208. A.J. Vogel - *Practical organic chemistry*" - Langmans, London 1964,p.971
209. H.-Ch. Curtius, Maria-Jolanta Zagalak, K. Baerlocher, J.Schaub, W. Leimbacher und U. Redweik - *Helv.paediatr.Acta*, 32,461-469(1977)
210. H.-Ch. Curtius, J.A. Voellmin und K. Baerlocher - *Clin.Chim.Acta*, 37, 277-285(1972)
211. H.-Ch. Curtius, J.A. Voellmin und K. Baerlocher - *Anal.Chem.* 45,1107(1973)
212. J.L. Johnson, B.E. Hainline, K.V. Rajagopalan und B.H. Arlson - *J.Biol. Chem.* 259,5414-5422(1984),Nr.9
213. S.K. Wadman, M. Duran, F.A. Beemer, B.P. Cats, J.L. Johnson, K.V. Rajagopalan, J.M. Saudubraly, H. Ogier, C. Charpentier, R. Berger, G.P.A. Smit, J. Wilson und S. Krywawych - *J. Inher.Metab.Dis.*6,78-83 (1983), Suppl.1
214. A. Niederwieser, N. Blau, M. Wang, P. Joller, M. Atarés und J. Cardesa-Garcia - *Eur.J.Pediatr.* 141,208-214(1984)

7. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit wurde in vier Kapitel unterteilt:

1. Ausarbeitung der analytischen Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Phenylalanin-4-Monooxygenase Aktivität.
2. Isolierung und Reinigung der Phenylalanin-4-Monooxygenase und Vergleich verschiedener Methoden.
3. Enzymatisch-kinetische Untersuchungen mit reinen Pterin-Derivaten : Coenzym-Aktivität.
4. Aktivitätsbestimmung der Phenylalanin-4-Monooxygenase für klinisch-diagnostische Zwecke.

Das Enzym Phenylalanin-4-Monooxygenase (EC 1.14.16.1) wurde aus Rattenleber isoliert und auf drei verschiedenen Wegen gereinigt. Eine hydrophobe Chromatographie mittels Phenyl-Sepharose-CL-4B stellte die schnellste und effektivste Technik dar.

Die analytischen Grundlagen für die Enzymaktivitätsbestimmung wurden ausgearbeitet. Der Enzym-assay wurde nach genaueren Untersuchungen neu gestaltet, wobei die optimale Zusammensetzung und das beste Puffersystem (Natriumphosphatpuffer, pH 7,6) ermittelt wurde.

Die Nachweismethoden für das entstehende L-Tyrosin wurden getestet. Ausser der allgemein bekannten spektralphotometrischen 1-Nitroso-2-naphthol Methode wurden noch die gaschromatographische, sowie die gaschromatographisch-massenspektrometrische Technik (mit Selected Ion Monitoring) als Messmethoden ausgearbeitet. Die notwendigen Synthesen der für Gaschromatographie geeigneten Derivate, sowie der deuteriummarkierten Aminosäuren wurden mit Erfolg durchgeführt.

Verschiedene Pterinderivate wurden auf ihre Cofaktorwirkung in der durch die Phenylalanin-4-Monooxygenase katalysierten Reaktion untersucht. Das 5,6(R),7,8-Tetrahydro-L-biopterin wurde eindeutig bevorzugt und auch mit 6(RS)-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin wurde eine sehr hohe Aktivität gemessen.

Die ausgearbeiteten analytischen Methoden wurden zur indirekten in vivo Bestimmung der Enzymaktivität beim Menschen angewendet und erlaubten eine spezifische Differenzierung zwischen Phenylketonurie- und Hyperphenylalaninämie-Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen. Dies stellt für die klinische Diagnostik eine bedeutende Hilfe dar.

8. ADDENDUM

Die letzten Jahre haben zu dem Thema "Phenylalanin-4-Monooxygenase" weitere Erkenntnisse gebracht. Der Wirkungsmechanismus dieses Enzyms ist im Zentrum des Interesses mehrerer Forscher gestanden.

Das 4a-Hydroxy- [215,216] oder aber 4a-Peroxy-Addukt [215] des Tetrahydropterinderivats wurde als mögliches Produkt betrachtet. Mit Hilfe der ^{13}C -Spektroskopie bei Temperaturen unterhalb von 0°C und mit 4a- ^{13}C -6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (90% selektive Anreicherung) als Cofaktor konnte man einen direkten Beweis für die enzymkatalysierte elektrophile Addition des Sauerstoffs am C(4a)-Zentrum des Pterincofaktors liefern [217]. Gleichzeitig konnte das labile Zwischenprodukt, das aus solchem 4a-Addukt durch Dehydration entsteht, als p-chinoides Isomer des Dihydropterins (siehe Abb.6) identifiziert werden [218,219].

Weitere Versuche zur Bestätigung der Formel dieses Dihydropterinisomers wurden mit C(6)-bisubstituiertem Tetrahydropterin unternommen, wodurch die Tautomerisierung zum 7,8-Dihydropterin verhindert, und somit die Stabilität der chinoiden Species erhöht wurde (Halbwertszeit: 1,25 Std. bei 37°C in 0,1M TRIS-HCl, pH 7,4) [220].

Die chemische Formulierung des Wirkungsmechanismus der Phenylalanin-4-Monooxygenase von Young [221] beinhaltetete das 4a-Hydroperoxid des Pterinderivats und die heterolytische Bindungsspaltung als die Schwerpunkte.

Parniak et al. [222] konnten in Gegenwart von L-Phenylalanin und Sauerstoff eine "suicide" Inaktivierung durch das 6(S)-Diastereomere des Tetrahydrobiopterins feststellen. Dithiothreitol (DTT) verhinderte diese Inaktivierung, die Zumischung des "natürlichen" 6(R)-Diastereomeren verlangsamte sie. Die Untersuchungen des Verhaltens von substituierten Tetrahydropterin- en [223] während der Autoxidation bestätigten nochmals die eminente Rolle des N(5)-Zentrums im Pteringerüst. Eine Alkyl- oder Aralkyl-Substitution dieses Zentrums verlangsamte die Autoxidationsrate, eine Acylierung stoppte sie vollkommen. Auch die Pyrimidon-Derivate wurden weiterhin (vergleiche S.89) als Cofaktoren verwendet [224] um die Struktur der Phenylalanin- hydroxylierenden Species feststellen zu versuchen.

Marota et al. [225] haben gefunden, dass in Gegenwart von Sauerstoff unabhängig von L-Phenylalanin das Enzym die stöchiometrischen Mengen von Cofaktor (1 mol : 1 Subeinheit des Enzyms) oxidiert, wobei das Enzym als ausschliesslicher Elektronenakzeptor zu wirken scheint. Diese Reduktion, die mit chemischen und physikalischen Veränderungen verbunden ist, ist für die Bildung des katalytisch aktiven Enzyms unentbehrlich.

Auch andere Autoren [226] haben sich mit dem gleichen Problem beschäftigt. Sie konnten bei einer solchen Reduktion des Enzyms mittels EPR-Spektroskopie die Reduktion von Fe^{3+} feststellen. Bei der Substrataktivierung der Phenylalanin-4-Monooxygenase ist das L-Phenylalanin der kontrollierende Faktor [227] , das heisst, dass zum Beispiel die Belastung von Ratten mit L-Phenylalanin den Anteil des aktivierten Enzyms um 40% erhöht.

Die Aktivierung des Enzyms basiert auf einer Konformationsveränderung, bei der die Tryptophan- und/oder Sulfhydrylgruppen der Cystein-Reste besser exponiert werden [228] . Zur strukturellen Aufklärung der Konformation der aktiven Phenylalanin-4-Monooxygenase hat man die Synthese von photolabilen Substratanaloga durchgeführt [229] .

Bei der Durchführung einer nichtenzymatischen Hydroxylierung des L-Phenylalanins [230] wurden mit EPR-Technik die Hydroxylradikale nachgewiesen. Diese Hydroxylierung wurde durch die Zugabe von Katalase vollkommen verhindert.

Die Anwesenheit zwei verschiedener Enzymformen wurde bei Sprague-Dawley-Ratten in der Leber und in den Nieren festgestellt [231] .

Sogar erste Versuche zum Gen-"cloning" wurden für die menschliche Phenylalanin-4-Monooxygenase unternommen [232] .

Die Ratten unter Diät mit niedrigem Protein- und hohem L-Phenylalanin-Gehalt entwickelten ein charakteristisches Phenylketonurie-Syndrom; zusätzlich zeigten sie jedoch noch typische Tyrosin-Toxizitäts-Symptome [233] . Eine Stimulierung des Enzyms wurde durch die Induktion des Diabetes bei Ratten erreicht. Diese Wirkung konnte bei der hohen Protein-Diät noch verstärkt werden [234] .

24 Stunden nach der partiellen Hepatoktomie bei der Ratte wird der Gehalt an Biopterin, sowie die Aktivitäten der Sepiapterin-Reduktase und der Dihydropteridin-Reduktase als unverändert gemessen. Die Aktivität der Phenylalanin-4-Monooxygenase erhöhte sich dagegen deutlich [235] .

Bei heterozygoten Müttern (PKU) wurden die täglichen Veränderungen der Plasmatyrosinwerte gemessen, und mit weiblichen Kontrollpersonen verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede festgestellt werden [236] .

215. S.J. Benkovic - *Ann.Rev.Biochem.* 49, 227-251(1980)

216. R.A. Lazarus, R.F. Dietrich, D.E. Wallick und S.J. Benkovic - *Biochemistry*, 20, 6834-6841(1981), Nr.24

217. R.A. Lazarus, C.W. DeBrosse und S.J. Benkovic - *J.Am.Chem.Soc.* 104, 6869-6871(1982), Nr.24

218. R.A. Lazarus, C.W. DeBrosse und S.J. Benkovic - *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6872-6873 (1982), Nr. 24
219. R.A. Lazarus, C.W. DeBrosse und S.J. Benkovic - in "Chemistry and Biology of Pteridines. Pteridines and Folic Acid Derivatives" ed. J.A. Blair, W. de Gruyter & Co., Berlin, New York 1983, S. 369-373
220. S.W. Bailey und June E. Ayling - *Biochemistry* 22, 1790-1798 (1983)
221. D.W. Young - in - wie Pos. 219, S. 321-344
222. M. Parniak und S. Kaufman - in - wie Pos. 219, S. 345-349
223. J.A. Jongejan, H.I.X. Mager und W. Berends - in - wie Pos. 219, S. 357-361
224. June E. Ayling und S.W. Bailey - in - wie Pos. 219, S. 363-367
225. J.J.A. Marota und R. Shiman - *Biochemistry* 23, 1303-1311 (1984), Nr. 6
226. D.E. Wallick, L.M. Bloom, Betty Jean Gaffney und S.J. Benkovic - *Biochemistry* 23, 1295-1302 (1984), Nr. 6
227. R. Shiman, G.E. Mortimore, C.M. Schworer und D.W. Gray - *J. Biol. Chem.* 257, 11213-11216 (1982), Nr. 19
228. R.S. Phillips, M.A. Parniak und S. Kaufman - *Biochemistry* 23, 3836-3842, (1984), Nr. 17
229. Stephanie Weber und J.M. Whiteley - in - wie Pos. 219, S. 351-355
230. S. Ishimitsu, S. Fujimoto und A. Chara - *Chem. Pharm. Bull.* 32, 752-756, (1984), Nr. 2
231. J.F.B. Mercer, A. Grimes, I. Jennings und R.G.H. Cotton - *Biochem. J.* 219, 891-898 (1984)
232. K.J.H. Robson, W.B. Cattie, R.J. James, R.G.H. Cotton, F.J. Morgan und S.L.C. Woo - *Biochemistry* 23, 5671-5675 (1984), Nr. 24
233. Y. Yamamoto, T. Suzuki und K. Muramatsu - *Agric. Biol. Chem.* 46, 2491-2497, (1982), Nr. 10
234. J. Donlon und E. Beirne - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 746-751 (1982), Nr. 2
235. J.-L. Dhondt, G. Karpatos, M. Parniak, H. Wilgus und S. Kaufman - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 786-793 (1982), Nr. 3
236. C.J. De Groot und F.A. Hommes - *Enzyme* 28, 404-407 (1982)

9. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ASC	- <u>A</u> scorbinsäure
BSTFA	- <u>N,N-Bis</u> (trimethylsilyl)-trifluoracetamid
DH	- <u>D</u> ihydro-Derivat
DHPt	- <u>D</u> ihydropterin
DTE	- <u>D</u> ithioerythritol
DTT	- <u>D</u> ithiothreitol
EPR	- <u>E</u> lectron paramagnetic resonance
G	- Gewicht
GC	- <u>G</u> aschromatographie
HEPES	- <u>N</u> (2)-Hydroxyethylpiperazin- <u>N'</u> (2)-ethansulfonsäure
HFB	- <u>H</u> ep ⁷ tafluorbutyryl-Derivat
HPA	- Hyperphenylalaninaemie
IUB	- <u>I</u> nternational <u>U</u> nion of <u>B</u> iochemistry
IUPAC	- <u>I</u> nternational <u>U</u> nion of <u>P</u> ure and <u>A</u> ppplied <u>C</u> hemistry
K·PO ₄	- K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ - Puffer
M	- Molare Konzentration, d.h. 1 mol/L
MES	- 2(<u>N-Morpholin</u>)-ethansulfonsäure
MER	- <u>M</u> er ⁷ captoethanol
Mol.	- Molekül
mol	- Grammoll
MS	- <u>M</u> assenspektrometrie
MSTFA	- <u>N-Methyl</u> trimethylsilyl-trifluoracetamid
Na·PO ₄	- Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ - Puffer
NMR	- <u>N</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance
Phe	- Phenylalanin
PKU	- Phenylketonurie
SIM	- <u>S</u> elective <u>i</u> on <u>m</u> onitoring
TAPS	- <u>T</u> ris(hydroxymethyl)-methylamin-propansulfonsäure
TFA	- <u>T</u> rifluoracetyl-Derivat
TMCS	- <u>T</u> rimethylchlorsilan
TMS	- <u>T</u> rimethylsilyl-Derivat
TRIS	- <u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	- Tyrosin
V	- Volumen

C U R R I C U L U M V I T A E

Name und Vornamen: Z A G A L A K - H O F M A N, Maria-Jolanta Krystyna

Heimat und Staatsangehörigkeit: P O L E N - Asylantin

Datum und Ort der Geburt: 15. Januar 1944, Radom (POLEN)

Zivilstand: verheiratet

Konfession: römisch - katholisch

Wohngemeinde: 8006 Zürich, Kreis 6

Wohnadresse: Stampfenbachstrasse 106, Tel.(01) 363'32'05

Vorbildung: PRIMARSCHULE: 1950 - 1957, Schule Nr.8, Poznan (POLEN)

GYMNASIUM: 1957 - 1961, Gymnasium Nr.II, Poznan (POLEN),
abgeschlossen mit Maturitätsprüfung am 6.Juni 1961

STUDIEN: 1961 - 1967, Fakultät für Mathematik - Physik - Chemie
(Phil.II), A.Mickiewicz Universität in Poznan (POLEN),
abgeschlossen am 27.Juni 1967 mit der Magisterarbeit
unter der Leitung von Prof.Dr. W. Kuczynski

Bisherige Stellen: Wissenschaftliches Laboratorium der Pharmazeutischen Fa-
brik "POLFA" in Poznan (POLEN):

1.10.1967 - 1.04.1968 Probezeit

1.04.1968 - 1.04.1969 Laborassistentin

1.04.1969 - 1.10.1970 Laborchefin

Medizinisch-chemisches Institut der Universitäts-Kinder-
klinik in Zürich:

1.02.1971 - 1.06.1972 Laborantin

1.06.1972 - 27.10.1975 Wissenschaftliche Mitarbeiterin

27.10.1975 - Sommer 1981 Dissertation unter der Leitung
von Prof.Dr.H.-Ch.Curtius und Betreuung von Prof.Dr.
M.Viscontini

Promotionsprüfung: am 16.04.1980 abgenommen von Prof.Dr. M.Viscontini und
Prof.Dr. M.Hesse

Gehörte Vorlesungen: Prof.M.Viscontini(OC-I), Prof.A.Dreiding u. Prof.H.Schmid
(OC-II), Prof.H.Schmid u. Prof.M.Hesse (OC-III), Prof.
M.Hesse u. Prof.C.H.Eugster(OC-IV), Organisch-chem. Se-
minar (Vortrag über Photochromie - Semesterprämie),
Prof.M.Viscontini (Chemie der Proteine u.Enzyme, Chemie
der heterocykl. Verbindungen, Chemie der Vitamine u.
Coenzyme), Prof.M.Hesse (Aspekte der Alkaloidchemie),
Prof.H.-Ch.Curtius (Spez.Probleme der klin. Biochemie).

